

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

MÉCANISMES BIOCHIMIQUES DE L'AMYLOÏDOSE À CHAÎNES LÉGÈRES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

MATHIEU LAPORTE WOLWERTZ

JANVIER 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche Steve Bourgault pour son soutien et ses conseils judicieux tout au long de mon parcours académique à l'UQAM. Il a grandement contribué à mon succès par la confiance qu'il a su me témoigner. J'ai toujours eu le sentiment qu'il ne ménageait aucun effort pour valoriser le travail de ses étudiants. Il me faut également souligner l'apport considérable de mes collègues de laboratoire et amis Carole Anne, Trang, Armelle, Noé, Clara et tous les autres. Chacun d'entre vous a participé à rendre cette expérience agréable.

Annabelle, tu es une femme extraordinaire. Ton amour et ton soutien me sont indispensables. Je veux aussi remercier ma famille qui m'est si précieuse. À ma mère France qui a toujours été présente pour moi, tant dans les meilleurs moments que dans les plus difficiles. Il n'y a pas assez d'espace sur cette page pour décrire ton importance dans ma vie. Michel et toi formez un couple extraordinaire, un exemple duquel s'inspirer. Je tiens à souligner l'infinie générosité de mes beaux-parents Sylvie et Sylvain, deux personnes qui ont le cœur en or. Merci à mon père John, sans qui je ne serais pas l'homme que je suis aujourd'hui. Enfin, un merci à mes amis, en particulier Éric, avec lesquels il est si facile de passer du bon temps.

Et à Raphaëlle, avec qui nous sommes tous impatients de faire plus ample connaissance...

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
ABBREVIATIONS ET SYMBOLES .....	ix
RÉSUMÉ .....	xiii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION .....	1
1.1 Maladies liées au mauvais repliement des protéines .....	1
1.2 Structures des fibres amyloïdes .....	4
1.2.1 Structure générale.....	4
1.2.2 Polymorphisme.....	6
1.3 Le mauvais repliement des protéines.....	7
1.3.1 La réaction de repliement des protéines .....	7
1.3.2 Facteurs énergétiques du repliement .....	8
1.3.3 Mauvais repliement protéique.....	9
1.4 Mécanismes de formation des fibres amyloïdes .....	11
1.4.1 Le mécanisme de croissance par nucléation .....	11
1.4.2 Les oligomères qui précèdent la formation des fibres amyloïdes : des protofibrilles structurées.....	12
1.4.3 Les oligomères qui précèdent la formation des fibres et des protofibrilles : des agrégats non structurés.....	14
1.4.4 Agrégation de protéines globulaires par le biais d'un dépliement partiel	14
1.4.5 Agrégation de protéines globulaires via la formation d'oligomères de conformation native.....	15
1.5 Facteurs qui influencent la formation de fibres amyloïdes.....	16
1.5.1 La séquence : hydrophobicité, charge et structure secondaire .....	16



1.5.2	Concentration en protéines.....	17
1.5.3	Encombrement par les macromolécules.....	18
1.5.4	Interaction avec des composés naturels .....	18
1.5.5	Vieillessement.....	19
1.5.6	Stress oxydatif et modifications post-traductionnelles.....	19
1.6	Pathogenèse des amyloïdoses .....	24
1.6.1	À la recherche de l'agent protéotoxique des amyloïdoses .....	25
1.6.2	La toxicité des agrégats préfibrillaires découle de leur nature dépliée ....	26
1.7	L'amyloïdose à chaînes légères .....	28
1.7.1	Myélome multiple et amyloïdose à chaînes légères.....	29
1.7.2	Structure des anticorps .....	29
1.7.3	Surreprésentation de lignées germinales et mutations somatiques .....	32
1.7.4	Influence de la stabilité thermodynamique sur l'amyloïdogénicité .....	33
1.7.5	Influence des sels sur l'amyloïdogénèse des chaînes légères .....	35
1.7.6	Effet de la concentration et de la dimérisation des domaines variables de LC sur la cinétique de formation de fibres amyloïdes .....	36
1.7.7	Stress oxydatif et modifications post-traductionnelles dans l'AL .....	37
1.8	Problématique, hypothèses et objectifs.....	38
CHAPITRE II		
PROBING THE ROLE OF $\lambda 6$ IMMUNOGLOBULIN LIGHT CHAIN		
DIMERIZATION IN AMYLOID FORMATION.....		
2.1	Résumé .....	41
2.2	Abstract.....	42
2.3	Introduction.....	43
2.4	Materials and methods .....	44
2.5	Results and discussion .....	47
2.6	Conclusions .....	52
2.7	References.....	61
2.8	References.....	65
2.9	Figures .....	69
2.9	Supporting information.....	74

CHAPITRE III	
EFFECTS OF OXIDATIVE STRESS-INDUCED POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS ON THE AMYLOIDOGENICITY AND CARDIOTOXICITY OF $\lambda$ 6 IMMUNOGLOBULIN LIGHT CHAIN .....	79
3.1 Résumé .....	80
3.2 Abstract.....	81
3.3 Introduction.....	82
3.4 Methods .....	85
3.5 Results and discussion .....	89
3.6 Conclusions .....	98
3.7 References.....	102
3.8 Tables.....	106
3.9 Figures .....	107
CHAPITRE IV	
DISCUSSION .....	113
CHAPITRE V	
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	121
BIBLIOGRAPHIE .....	124

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Structure générale des fibres amyloïdes ..... 5
1.2	Diagramme illustrant le processus de repliement d'une protéine globulaire typique (adapté de (Gomes, 2012))..... 8
1.3	Effets des mutations et des conditions défavorables sur le paysage énergétique du repliement des protéines..... 10
1.4	L'oxydation de la méthionine peut mener au sulfoxyde, et dans des conditions plus dures, à la sulfone. .... 22
1.5	Nitration de la tyrosine en 3-nitrotyrosine. .... 23
1.6	Représentation schématique de la structure de l'anticorps (A), des régions de la chaîne légère (B) et de la structure du domaine variable (C)..... 31
1.7	Comparaison des séquences en acides aminés des protéines Wil et Jto avec le produit prédit pour le gène de la lignée germinale $\lambda 6a$ . .... 34
2.1	Concentration-dependent dimerization of $V_L \lambda 6$ Wil in low ionic strength solution..... 69
2.2	Effect of protein concentration on the kinetics of Wil amyloid formation.... 70
2.3	Dimerization inhibits the conformational transition associated with amyloid formation..... 71
2.4	Thermal and chaotropic stability of $V_L \lambda 6$ as a function of quaternary structure ..... 72
2.5	Toxicity of $V_L \lambda 6$ on cardiomyoblasts..... 73
3.1	Verification of HNE-modification, nitration and oxidation of Wil induced by HNE, $H_2O_2$ and tetranitromethane by LC-TOF-MS..... 107
3.2	Effect of post-translational modifications on the kinetics of Wil amyloid formation..... 109
3.3	Effect of post-translational modifications on the secondary and tertiary structures of native Wil..... 110

3.4	Effect of post-translational modifications on the thermal stability of native Wil .....	111
3.5	Effect of post-translational modifications on the structural properties of the resulting fibrils of Wil.....	112

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1	Maladies humaines associées à la formation de dépôts amyloïdes..... 3
1.2	Modifications post-traductionnelles non enzymatiques qui peuvent jouer un rôle dans la formation de fibres amyloïdes. .... 21
3.1	Verification of modified amino acid residues of Wil by LC/MS/MS ..... 106
3.2	Kinetic parameters of amyloid formation ..... 106



## ABBREVIATIONS ET SYMBOLES

### Produits chimiques et solvants

<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de carbone
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétraacétique
<b>GdnHCl</b>	Hydrochlorure de guanidine
<b>HCl</b>	Acide hydrochlorique
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfate de magnésium
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>SDS</b>	Dodécylsulfate de sodium
<b>ThT</b>	Thioflavine T
<b>TNM</b>	Tétranitrométhane

### Unités de mesure

<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>Å</b>	Angstrom
<b>a.u.</b>	Unité arbitraire
<b>C<sub>m</sub></b>	Concentration de dénaturation
<b>cm</b>	Centimètre
<b>cm<sup>-1</sup></b>	Réciproque du centimètre
<b>CPS</b>	Compte par seconde
<b>Da</b>	Dalton
<b>deg</b>	Degré
<b>g</b>	Gramme
<b>kDa</b>	Kilodalton

<b>kJ</b>	Kilojoule
<b>h</b>	Heure
<b>L</b>	Litre
<b>M</b>	Molaire
<b>mg</b>	Milligramme
<b>µg</b>	Microgramme
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Millilitre
<b>ml<sup>-1</sup></b>	Réciproque du millilitre
<b>µL</b>	Microlitre
<b>µm</b>	Micromètre
<b>mm</b>	Millimètre
<b>mM</b>	Millimolaire
<b>mol</b>	Mole
<b>MRE</b>	« <i>Mean residue ellipticity</i> »
<b>ms</b>	Milliseconde
<b>mW</b>	Milliwatt
<b>m/z</b>	Masse sur charge
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>rpm</b>	Rotation par minute
<b>s</b>	Seconde
<b>T<sub>m</sub></b>	Température de fusion
<b>U</b>	Unité d'activité enzymatique
<b>V</b>	Volt

### **Méthodes d'analyse**

<b>AFM</b>	Microscopie à force atomique
<b>DLS</b>	Diffusion dynamique de la lumière
<b>LC</b>	Chromatographie en phase liquide
<b>MET</b>	Microscopie électronique en transmission

<b>MS</b>	Spectrométrie de masse
<b>PICUP</b>	Réticulation photo-induite de protéines non modifiées
<b>RMN-ÉS</b>	Résonance magnétique à l'état solide
<b>SEC</b>	Chromatographie d'exclusion stérique
<b>TOF</b>	Temps de vol
<b>Autres</b>	
<b>A<math>\beta</math></b>	Amyloïde $\beta$
<b>AL</b>	Amyloïdose à chaînes légères
<b>ANS</b>	Acide 8-anylino naphthalène-1-sulfonique
<b>CD</b>	Dichroïsme circulaire
<b>CDR</b>	Région déterminant la complémentarité
<b>CFTR</b>	Régulateur de la perméabilité transmembranaire de la fibrose kystique
<b>C<sub>H</sub></b>	Domaine constant de chaîne lourde
<b>C<sub>L</sub></b>	Domaine constant de chaîne légère
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>FBS</b>	Sérum fœtal bovin
<b>FTIR</b>	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycane
<b>HC</b>	Chaîne lourde d'anticorps
<b>HNE</b>	4-hydroxy-2-nonéanal
<b>IAPP</b>	Amyline ou « <i>Islet amyloid polypeptide</i> »
<b>LC</b>	Chaîne légère d'anticorps
<b>LB</b>	Lysogeny broth
<b>MM</b>	Myélome multiple
<b>polyQ</b>	Polyglutamine
<b>PTG</b>	« <i>Post transcriptional gene silencing</i> »
<b>PTM</b>	Modification post-traductionnelle
<b>RNS</b>	Dérivés réactifs de l'azote

<b>ROS</b>	Dérivés réactifs de l'oxygène
<b>RT</b>	Température pièce
<b>TTR</b>	Transthyrétine
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>V<sub>H</sub></b>	Domaine variable de chaîne lourde
<b>V<sub>L</sub></b>	Domaine variable de chaîne légère

## RÉSUMÉ

Les amyloïdoses sont un ensemble de maladies associées à l'accumulation d'agrégats protéiques, souvent sous structure amyloïde, dans l'espace extracellulaire de tissus et d'organes. L'amyloïdose à chaînes légères (AL) est la forme d'amyloïdose systémique la plus répandue. Cette maladie létale découle de l'accumulation systémique de chaînes légères d'anticorps (LCs) suite à leur hypersécrétion par un clone de lymphocyte B anormalement prolifératif. Chez les patients souffrant d'AL, une grande quantité de chaînes légères libres est sécrétée dans la circulation sanguine, celles-ci subissent un mauvais repliement et s'assemblent en fibres amyloïdes. L'accumulation de ces agrégats insolubles dans l'espace extracellulaire d'organes vitaux, dont les reins, le cœur et le foie, mène à la défaillance de ces organes et éventuellement au décès du patient atteint.

Dans le contexte de l'AL, ni les mécanismes qui mènent à l'auto-assemblage des chaînes légères (LCs), ni la base moléculaire qui entraîne la défaillance des organes ne sont bien compris. Dans le cadre de ce projet, nous avons initialement étudié la relation entre la structure quaternaire, la stabilité et l'amyloïdogénicité de deux domaines variables ( $V_L$ ) de LC de la lignée  $\lambda 6$ . Nous avons observé que le  $V_L$  amyloïdogénique Wil ainsi que le  $V_L$  non amyloïdogénique Jto s'assemblent en homodimère de façon dépendante de la concentration et que l'affinité du dimère diminue considérablement en présence d'une force ionique élevée. Nos résultats ont montré que la forme dimérique ralentit le changement conformationnel associé à l'assemblage de fibres amyloïdes et que la forme monomérique est essentielle pour initier l'amyloïdogénèse. Des études de dénaturation ont révélé que les monomères et les dimères de  $V_L$   $\lambda 6$  ont des stabilités thermodynamiques équivalentes. Ceci suggère que l'effet protecteur procuré par la dimérisation n'est pas dû à une plus grande stabilité thermodynamique, mais plutôt à certaines caractéristiques structurales défavorables à l'agrégation. La toxicité des monomères de Jto et de Wil a été évaluée sur des cardiomyoblastes et les espèces protéiques non amyloïdes ont réduit la viabilité cellulaire. Ces résultats qui montrent que la dimérisation des LCs  $\lambda 6$  ralentit la formation de fibres amyloïdes ouvrent une avenue prometteuse. En effet, une petite molécule stabilisant le dimère dans l'équilibre monomère-dimère pourrait freiner la fibrillation et ainsi ralentir la progression de la pathologie de l'AL.

Malgré le fait que l'implication de modifications post-traductionnelles (PTMs) dans plusieurs maladies amyloïdes a été étudiée, peu d'éléments sont connus au sujet de leur impact sur la stabilité et l'amyloïdogénicité des LCs. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'impact de trois PTMs, soit la carbonylation par



l'hydroxynonéal (HNE), l'oxydation et la nitration, sur l'amyloïdogénicité, la stabilité thermodynamique et la structure de Wil. Nos résultats ont montré que la carbonylation et la nitration de Wil influencent sa propension à former des agrégats et des fibres en conditions physiologiques. Des analyses par spectroscopie CD et par dénaturation thermique ont indiqué que la carbonylation a modifié les changements structuraux qui entraînent le processus d'agrégation et a mené à la formation d'agrégats majoritairement amorphes. Par contre, la nitration a engendré la formation d'agrégats fibrillaires et son effet sur l'amyloïdogénicité découle principalement d'une réduction de la stabilité thermodynamique. Malgré le fait que Wil a été modifié de façon importante par ces traitements, les PTMs n'ont affecté son amyloïdogénicité que modérément, ce qui suggère que Wil est relativement résilient à cet égard.

Dans l'ensemble, notre étude renforce la notion que dans le contexte de l'AL, la stabilité thermodynamique et les propriétés structurales doivent toutes deux être considérées lors de l'évaluation de l'amyloïdogénicité de domaines variables de chaînes légères. La majorité des études récentes portant sur l'AL ont ciblé l'identification de mutations qui peuvent engendrer une diminution de la stabilité des chaînes légères. Les résultats de ce projet de recherche montrent qu'il est tout aussi important de mettre en lumière les changements structuraux qui exposent certaines régions hydrophobes favorables aux interactions intermoléculaires et/ou qui altèrent le potentiel électrostatique de surface, deux facteurs qui peuvent favoriser l'amyloïdogénicité des LCs.

Mots clés : amyloïde; amyloïdose à chaînes légères; anticorps; dimérisation; modification post-traductionnelle ; agrégation.

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### **1.1 Maladies liées au mauvais repliement des protéines**

Un large éventail de maladies humaines découle du fait qu'une chaîne polypeptidique spécifique est incapable d'adopter ou de conserver sa conformation native fonctionnelle. Ces conditions pathologiques sont généralement regroupées sous le terme «maladies associées au mauvais repliement des protéines». Dans certains cas, la maladie survient lorsque l'inefficacité du repliement d'une protéine donnée engendre une diminution de la quantité disponible pour accomplir sa fonction biologique. Cette diminution peut résulter de plusieurs processus post-traductionnels telle l'augmentation de la probabilité de dégradation par le système de contrôle de qualité du réticulum endoplasmique, comme c'est le cas dans la mucoviscidose (Amaral, 2004), ou le mauvais trafic de la protéine tel qu'observé dans l'emphysème précoce (Lomas et Carrell, 2002). On parle dans ces cas de maladies liées à la perte de fonction protéique. Toutefois, la majorité des maladies associées au mauvais repliement des protéines se manifestent lorsqu'un peptide ou une protéine spécifique subit une conversion de sa conformation fonctionnelle soluble en agrégats fibrillaires. La formation de dépôts protéiques insolubles s'avère généralement nocive pour l'individu et est associée aux maladies liées à un gain de fonction toxique. Lorsqu'ils s'accumulent dans l'espace extracellulaire, ces agrégats sont généralement décrits comme des fibres amyloïdes tandis qu'ils sont nommés inclusions intracellulaires lorsqu'ils se forment à l'intérieur de la cellule (Westermarck et al., 2005).

Une protéine nouvellement synthétisée se replie habituellement en une conformation globulaire fonctionnelle dont les structures secondaire et tertiaire sont stables et bien définies. Dans cette conformation appelée repliée ou native, une protéine est généralement soluble et stable sous les conditions physiologiques. Il est alors peu probable qu'elle subisse une agrégation puisque la majorité de ses domaines hydrophobes ainsi qu'une grande partie de sa chaîne principale sont séquestrés au centre de la protéine (Campioni et al., 2010). Pour cette raison, le premier événement qui engendre l'agrégation d'une protéine en fibres amyloïdes est l'adoption d'un état partiellement ou globalement déplié (Kelly, 1998).

De façon générale, les maladies associées à la formation de fibres amyloïdes peuvent être classées en trois grandes catégories : les maladies neurodégénératives, dans lesquelles l'agrégation se produit au niveau du cerveau, les amyloïdoses localisées non neuropathiques, dans lesquelles un seul type de tissu (autre que le cerveau) est affecté, et les amyloïdoses systémiques non neuropathiques, dans lesquelles plusieurs types de tissus sont affectés (**Tableau 1.1**).

**Tableau 1.1** Maladies humaines associées à la formation de dépôts amyloïdes

Maladie	Protéine ou peptide impliqué	Structure native de la protéine ou du peptide	Référence
<u>Maladies neurodégénératives</u>			
Maladie de Huntington	Huntingtine avec expansion de polyglutamine	Nativement largement dépliée	(Thakur et al., 2009)
Maladie d'Alzheimer	Peptide $\beta$ -amyloïde	Nativement dépliée	(Khandogin et Brooks, 2007)
Sclérose amyotrophique latérale	Superoxyde dismutase 1	Tout $\beta$ , «Ig like»	(Strange et al., 2003)
<u>Amyloïdoses systémiques non neuropathiques</u>			
Amyloïdose à chaînes légères	Chaînes légères d'immunoglobuline	Tout $\beta$ , «Ig like»	(Serpell et al., 2000)
Amyloïdose AA	Fragments de la protéine sérum amyloïde A	Tout $\alpha$ , hexamère	(Lu et al., 2014)
Amyloïdose systémique sénile	Transthyrétine type sauvage	Tout $\beta$ , tétramère	(Hamilton et Benson, 2001)
Polyneuropathie familiale amyloïde	Mutants de transthyrétine	Tout $\beta$ , tétramère	(Hamilton et Benson, 2001)
<u>Amyloïdoses localisées non neuropathiques</u>			
Amyloïdose atriale	Facteur atrial natriurétique	Nativement dépliée	(Abedini et Raleigh, 2009)
Diabète de type II	Amyline ou «islet amyloid polypeptide» (IAPP)	Nativement dépliée	(Kayed et al., 1999)
Carcinome médullaire de la thyroïde	Calcitonine	Nativement dépliée	(Abedini et Raleigh, 2009)
Myosite à inclusions	Peptide $\beta$ -amyloïde	Nativement dépliée	(Khandogin et Brooks, 2007)

## 1.2 Structures des fibres amyloïdes

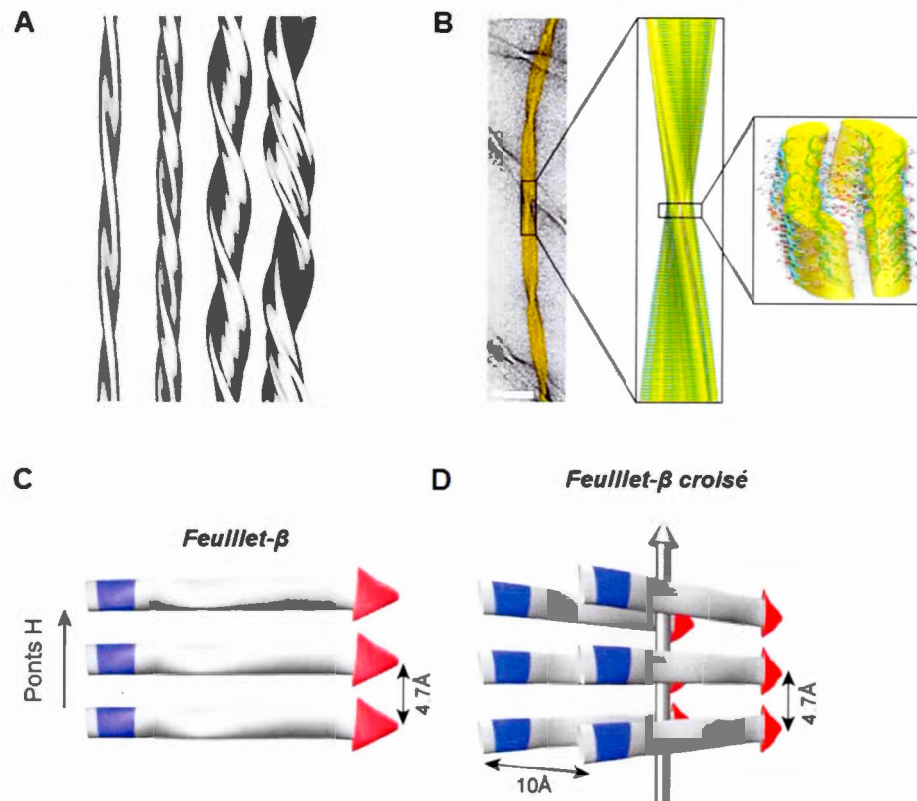
### 1.2.1 Structure générale

Les fibres amyloïdes sont des agrégats insolubles qui résultent de l'auto-assemblage de centaines, voire de milliers de polypeptides monomériques partiellement dépliés. Malgré le fait que les polypeptides précurseurs impliqués dans les différentes formes d'amyloïdose ont des séquences et des structures à l'état natif différentes, la morphologie et les propriétés de toutes les fibres amyloïdes sont remarquablement similaires. Quelle que soit la structure native du précurseur, la structure secondaire prédominante au sein de la fibre est le feuillet- $\beta$  (Cohen-Krausz et Saibil, 2006).

Les fibres amyloïdes sont de longues structures non ramifiées de 5 à 15 nm de diamètre. Elles sont constituées de sous-structures associées latéralement, appelées protofilaments. Ces derniers sont eux-mêmes formés de minces fibres qui s'entortillent ensemble pour former une fibre amyloïde (Shirahama et Cohen, 1967; Kirschner et al., 1987; Goldsbury et al., 1997; Serpell et al., 2000). Ceci donne à la fibre amyloïde une apparence torsadée avec une périodicité régulière (Toyama et Weissman, 2011). Le nombre et l'arrangement des protofilaments peuvent varier considérablement d'une fibre amyloïde à l'autre (**Fig. 1.1A.** et **Fig. 1.1B.**) (Jimenez et al., 1999; Jimenez et al., 2002).

Les protofilaments sont formés d'un grand nombre de feuillets- $\beta$  organisés en structure quaternaire de feuillets- $\beta$ -croisés. Les feuillets- $\beta$  sont orientés parallèlement à l'axe de la fibre et sont constitués de brins- $\beta$ . Pour leur part, les brins- $\beta$  sont orientés perpendiculairement à l'axe de la fibre et sont liés entre eux par des ponts hydrogène parallèles à l'axe de la fibre (**Fig. 1.1C.** et **Fig. 1.1D.**) (Sunde et al., 1997; Tycko, 2014). Les feuillets- $\beta$  peuvent être organisés de façon antiparallèle ou parallèle, mais l'orientation parallèle est la plus commune (Toyama et Weissman, 2011).





**Figure 1.1** Structure générale des fibres amyloïdes

(A) Représentation tridimensionnelle de quatre types de fibres formées à partir de l'insuline. De gauche à droite : une fibre formée à partir de deux, de quatre et de six protofilaments et une fibre sous la forme de ruban tordu (tiré de (Jimenez et al., 2002)). (B) À gauche : fibre de transtyréthine (TTR) en microscopie électronique en transmission (barre d'échelle, 50 nm). Au centre : structure à résolution atomique par RMN d'une fibre de TTR formée de trois protofilaments. À droite : section de fibre avec brins- $\beta$  en bleu (tiré de (Fitzpatrick et al., 2013)). (C) Représentation schématique d'un feuillet- $\beta$  formé de trois brins- $\beta$ . (D) Représentation schématique d'une structure en feuillet- $\beta$ -croisé formée de deux feuillets- $\beta$ . La flèche grise représente la direction de l'axe de la fibre. (C) et (D) : (adapté de (Smith et al., 2014)).

En diffraction des rayons X, des bandes répétitives caractéristiques apparaissent à tous les 4.7 Å le long de l'axe de la fibre. Elles correspondent à la distance entre les brins- $\beta$  à l'intérieur des feuillets- $\beta$ . Une réflexion de 10 Å perpendiculaire à l'axe de la fibre est attribuée à l'empilement des feuillets- $\beta$  voisins (**Fig. 1.1C.** et **Fig. 1.1D.**) (Cohen-Krausz et Saibil, 2006). Les fibres amyloïdes ont la propriété de lier certains colorants tels la thioflavine T (ThT) et le rouge Congo («Congo red») (Nilsson, 2004). Cependant, la sensibilité et la spécificité de l'interaction entre le rouge Congo et les fibres amyloïdes ont été remises en question à plusieurs reprises (Khurana et al., 2001; Bely et Makovitzky, 2006; Clement et Truong, 2014).

### 1.2.2 Polymorphisme

Avant même que les structures moléculaires des fibres amyloïdes ne commencent à être élucidées, il apparaissait déjà qu'il existait une importante variation morphologique entre différentes fibres formées par le même peptide ou la même protéine (Bauer et al., 1995; Jimenez et al., 1999; Jimenez et al., 2002). Il semble que cette variabilité morphologique est due à une hétérogénéité dans la structure au niveau moléculaire, plus précisément dans le positionnement des chaînes polypeptidiques à l'intérieur des fibres amyloïdes. L'hormone peptidique glucagon est un exemple de cette hétérogénéité. En effet, les fibres formées par ce peptide à différentes températures (entre 25 à 50°C) sont distinctes morphologiquement: des analyses spectroscopiques de CD (dichroïsme circulaire) et de FTIR (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) ont révélé des variations dans la structure secondaire des peptides formant ces différentes fibres (Pedersen et al., 2006). Une étude particulièrement importante dans le contexte du polymorphisme amyloïde s'est intéressée à l'origine de différences morphologiques entre les fibres de peptide bêta-amyloïde ( $A\beta_{1-40}$ ) selon que l'échantillon a été préparé avec ou sans agitation. L'analyse de ces différents échantillons par RMN-ÉS (résonance magnétique nucléaire à l'état solide) a démontré que ce polymorphisme est dû à des différences dans la structure moléculaire (Petkova et al., 2005).

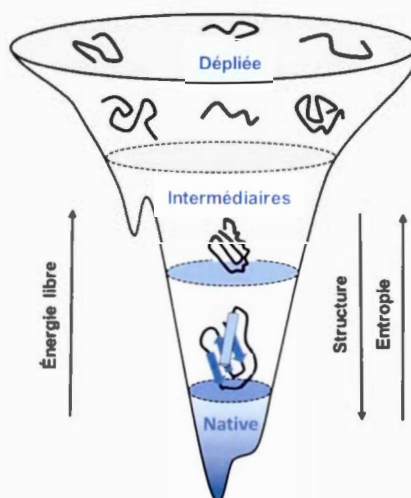
Dans ces cas de figure, des noyaux de polymérisation préformés peuvent propager leur morphologie, supplantant l'influence de la séquence ou des conditions sur la structure des fibres formées. Les fibres résultantes possèdent alors les caractéristiques du noyau de polymérisation (Jones et Surewicz, 2005; Petkova et al., 2005; Tanaka et al., 2005; Pedersen et al., 2006). Ces résultats montrent que chaque séquence protéique peut engendrer un spectre d'agrégats fibrillaires de structures distinctes et que les facteurs cinétiques peuvent dicter quelle structure sera dominante selon les conditions.

### **1.3 Le mauvais repliement des protéines**

#### **1.3.1 La réaction de repliement des protéines**

Le repliement d'une protéine se fait par un mécanisme universel qui engendre la structure la plus stable en conditions physiologiques (Dobson, 2006). La conformation native n'est pas obtenue par une recherche systématique de toutes les conformations possibles puisque ceci prendrait beaucoup trop de temps. Le processus de repliement se fait plutôt par une recherche aléatoire, mais hiérarchique, des conformations accessibles au polypeptide. Ce processus est efficace, car les structures proches de l'état natif ont un niveau énergétique plus bas et sont favorisées par rapport aux conformères non natifs. Au cours du repliement, plus le nombre d'interactions favorables augmente, plus l'éventail de conformations possibles diminue. Une fois la configuration de l'état de transition atteinte, la réaction de repliement procède inévitablement vers la conformation native. Il existe donc un paysage énergétique à travers lequel les protéines peuvent naviguer pendant la réaction de repliement : ce paysage énergétique peut être apparenté à un entonnoir (**Fig. 1.2.**) puisque le nombre de conformations possibles diminue à mesure que le repliement se rapproche de l'état natif (Dill et Chan, 1997; Onuchic et Wolynes, 2004; Thirumalai et al., 2010).





**Figure 1.2** Diagramme illustrant le processus de repliement d'une protéine globulaire typique (adapté de (Gomes, 2012))

### 1.3.2 Facteurs énergétiques du repliement

Le processus de repliement implique un échange énergétique important. La variation favorable d'enthalpie résultant des interactions établies au cours du repliement compense la perte entropique de la chaîne peptidique (Ivarsson et al., 2008). Les forces qui résultent de l'effondrement des chaînes latérales d'acides aminés hydrophobes représentent le facteur principal permettant d'atteindre la conformation native : en établissant des interactions au cœur de la protéine, où l'eau est absente, la stabilité des groupes hydrophobes augmente, formant un noyau serré. Malgré le fait que prise individuellement, la force créée par une interaction hydrophobe est faible, la somme de celles-ci apporte une stabilisation énergétique importante. Ceci s'applique également aux autres interactions qui façonnent la structure d'une protéine, dont les ponts hydrogènes, les interactions électrostatiques et les forces de Van Der Waals. Globalement, l'ensemble de ces forces permet à la stabilisation enthalpique de contrebalancer la baisse d'entropie configurationnelle. Au final, l'équilibre entre ces deux composantes énergétiques opposées ne permet à la conformation native que d'être marginalement stable. Cette stabilité fragile est une propriété importante des

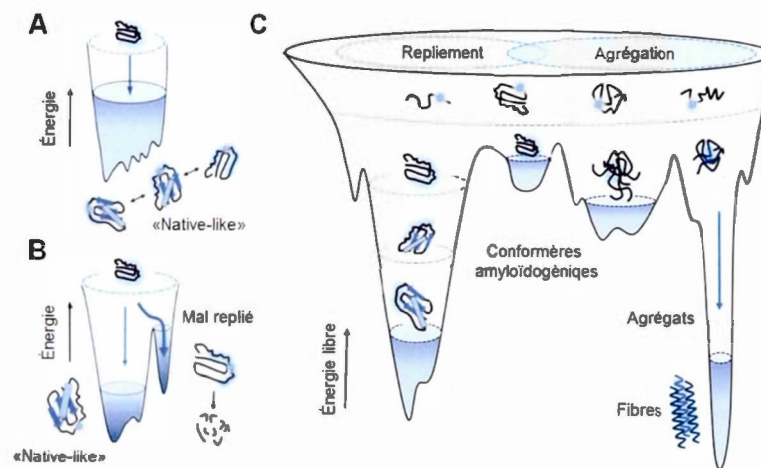
protéines : elle est étroitement liée au comportement dynamique qui leur permet d'accomplir une multitude de fonctions biologiques.

### 1.3.3 Mauvais repliement protéique

Il apparaît donc qu'une modification de la séquence primaire et/ou un changement dans l'environnement physico-chimique peut avoir un impact majeur sur la stabilité de l'état natif et/ou sur le processus de repliement dans les systèmes biologiques. Dans certaines circonstances, la régulation du repliement par les chaperones et par les systèmes de contrôle qualité est insuffisante pour prévenir la formation de structures protéiques déstabilisées et/ou d'agrégats (Chiti et Dobson, 2006; Gregersen et al., 2006).

Le mauvais repliement protéique peut être défini comme un remodelage du paysage conformationnel (**Fig. 1.3.**). Ce remodelage peut se faire selon trois cas de figure : le premier résulte en une protéine déstabilisée, le deuxième en l'accumulation d'intermédiaires de repliement instables, et le dernier en la formation d'agrégats. Dans le premier cas, qui mène aux maladies liées à la perte de fonction, le bassin au bas de l'entonnoir s'aplatit et s'élargit légèrement jusqu'à des niveaux énergétiques plus élevés dans le voisinage de l'état natif (**Fig. 1.3A.**). Une conséquence de cet effet est que la protéine n'est plus restreinte à un minimum local correspondant à l'état natif, mais peut plutôt fluctuer dans son voisinage (Gomes, 2012). Ceci permet la formation de conformères quasi natifs («native-like») qui sont moins stables que le repliement natif. Dans ce genre de situation, des mutations engendrent des protéines qui deviennent incapables d'accomplir leurs fonctions suite à une déstabilisation conformationnelle, un mauvais repliement, une séquestration par les chaperones, ou une dégradation plus importante (Gomes, 2012).





**Figure 1.3** Effets des mutations et des conditions défavorables sur le paysage énergétique du repliement des protéines

(A) Élargissement de la portion inférieure de l'entonnoir de repliement suite à une mutation ou des conditions défavorables. Il en résulte une diminution des barrières énergétiques entre conformères quasi natifs. (B) Accumulation de conformères mal repliés de plus haute énergie dans une trappe énergétique, suite à une mutation ou des conditions défavorables. Ces protéines mal repliées ne sont pas fonctionnelles et sont dégradées. (C) Ouverture d'un entonnoir d'agrégation en raison d'une augmentation de la quantité de conformères amyloïdogéniques, suite à une mutation ou des conditions défavorables (figure adaptée de (Gomes, 2012)).

Dans le deuxième cas, des conditions défavorables entraînent la formation d'une trappe énergétique au cours du repliement (**Fig. 1.3B.**). Ceci a pour conséquence l'accumulation d'un intermédiaire de repliement, menant au déplacement de la voie de repliement vers un cul-de-sac cinétique et une trappe énergétique. Dans ce cas de figure, les niveaux de protéines correctement repliées baissent et les conformères mal repliés sont dégradés avant d'arriver à leur compartiment cellulaire de destination : ceci engendre une perte de fonction. La  $\beta$ -glucocérébrosidase dans la maladie de

Gaucher et la protéine CFTR («Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator») dans la mucoviscidose sont des exemples de ce cas de figure (Gomes, 2012).

Dans le dernier cas, un facteur génétique ou environnemental perturbe le processus de repliement et induit un mauvais repliement ou déstabilise la protéine d'une façon qui rend accessible énergétiquement la portion «agrégation» de l'entonnoir (**Fig. 1.3C.**). Par différents mécanismes, des intermédiaires partiellement dépliés enclins aux interactions intermoléculaires s'accumulent. La prédisposition à ces interactions favorise alors une voie d'agrégation qui prend le dessus sur la voie de repliement (Chiti et Dobson, 2006; Chiti et Dobson, 2009). Le résultat final est la formation d'agrégats que le système de contrôle de qualité des protéines peut difficilement éliminer. Ces structures sont très résistantes à la dégradation et peuvent entraîner l'agrégation d'autres protéines. Elles affectent donc considérablement le réseau de l'homéostasie protéique. Des exemples de ce cas de figure sont la maladie d'Alzheimer, la polyneuropathie familiale amyotrophique et l'amyloïdose à chaînes légères

## **1.4 Mécanismes de formation des fibres amyloïdes**

### **1.4.1 Le mécanisme de croissance par nucléation**

La formation de fibres amyloïdes est souvent décrite comme étant un mécanisme de «croissance par nucléation». Le processus de conversion d'un polypeptide en sa forme fibrillaire présente dans un premier temps une phase de latence. Elle est suivie par une phase de croissance exponentielle rapide (Naiki et al., 1997; Serio et al., 2000; Uversky et al., 2002; Pedersen et al., 2004). Il est présumé que la phase de latence correspond au temps requis pour qu'un «noyau» se forme. Une fois le noyau assemblé, la formation des fibres se produit rapidement par l'association de monomères ou d'oligomères avec ce noyau.

Le mécanisme de croissance par nucléation a été étudié de façon expérimentale et théorique dans de nombreux autres contextes, particulièrement dans le cadre du processus de cristallisation (Chayen, 2005). Comme dans plusieurs autres processus (dont la cristallisation) qui dépendent d'une étape de nucléation, l'ajout d'espèces fibrillaires préformées à un échantillon de protéine soumis à des conditions d'agrégation (« seeding ») fait en sorte que la phase de latence est raccourcie et parfois même éliminée, car la vitesse d'agrégation n'est plus limitée par la nécessité de former un noyau (Naiki et al., 1997; Serio et al., 2000). Malgré le fait que les fibres amyloïdes n'apparaissent pas de façon significative au cours de la phase de latence, il semble de plus en plus évident que cette étape représente un événement important au cours duquel une variété d'oligomères se forment, incluant des espèces riches en feuillets- $\beta$  qui fournissent le noyau requis pour l'assemblage des fibres matures.

#### **1.4.2 Les oligomères qui précèdent la formation des fibres amyloïdes : des protofibrilles structurées**

Récemment, des efforts importants ont été déployés afin d'identifier, d'isoler et de caractériser les espèces oligomériques présentes en solution avant l'apparition des fibres amyloïdes, d'une part en raison de leur rôle probable dans le mécanisme de formation des fibres et d'autre part en raison de leur implication en tant qu'espèces toxiques. De nombreux travaux ont été réalisés avec le peptide  $\beta$ -amyloïde dont l'agrégation est associée à la maladie d'Alzheimer. L'agrégation de ce peptide est précédée par la formation d'une série d'espèces métastables non fibrillaires qui peuvent être visualisées par microscopie à force atomique (AFM) et par microscopie électronique en transmission (MET) (Harper et al., 1997a; Harper et al., 1997b; Walsh et al., 1997; Walsh et al., 1999). Certaines d'entre elles ressemblent à des billes sphériques de 2 à 5 nm de diamètre, tandis que d'autres prennent la forme d'une chaîne de billes dont les diamètres sont encore une fois de 2 à 5 nm. D'autres apparaissent comme des structures annulaires qui semblent être formées par ces



chaînes de billes. Tous ces agrégats, qui ont été appelés protofibrilles par les auteurs qui les ont observés (Harper et al., 1997a; Harper et al., 1997b; Walsh et al., 1997; Walsh et al., 1999), ne doivent pas être confondus avec les protofilaments qui sont les unités constitutives des fibres amyloïdes matures. Les protofibrilles du peptide  $\beta$ -amyloïde lient le rouge Congo et la thioflavine T, contiennent une grande proportion de structures en feuillet- $\beta$ , et, lorsqu'elles prennent la forme des petites espèces sphériques, sont constituées d'environ 20 molécules (Kayed et al., 2004).

Des structures sphériques ainsi que des structures ayant l'apparence de chaînes ont été observées dans de nombreux autres systèmes dont l' $\alpha$ -synucléine (Conway et al., 2000), l'amyline (Kayed et al., 2004), les chaînes légères d'anticorps (Ionescu-Zanetti et al., 1999), la transthyrétine (Quintas et al., 2001), les protéines avec expansion de polyglutamine (polyQ) (Kayed et al., 2004), et la  $\beta$ 2-microglobuline (Gosal et al., 2005). Globalement, ces espèces sont riches en feuillets- $\beta$  et possèdent une régularité structurale suffisante pour lier le rouge Congo et la thioflavine T. Le fait qu'un anticorps spécifique peut se lier à des espèces protofibrillaires provenant de différents polypeptides, mais qu'il ne peut pas se lier aux formes monomériques ou fibrillaires correspondantes, suggère que ces oligomères ont certains éléments structuraux importants en commun (Kayed et al., 2003).

Il a été démontré que, dans certains cas, des protofibrilles peuvent être «on-pathway» vers la formation de fibres amyloïdes (Harper et al., 1997b; Serio et al., 2000). Dans d'autres cas, elles semblent plutôt être «off-pathway» (Morozova-Roche et al., 2004; Gosal et al., 2005), c'est-à-dire qu'elles ne peuvent pas évoluer directement en fibres amyloïdes. En général, ces espèces «off-pathway» doivent se dissocier en monomères avant d'être impliquées dans la formation de fibres amyloïdes (Hannan, 2012). L'assemblage en espèces «off-pathway» peut donc ralentir significativement la cinétique de fibrillation (Bitan et Rahimi, 2012). Indépendamment du rôle joué par les protofibrilles dans le processus de formation des fibres amyloïdes, l'élucidation de

leur mécanisme de formation et de leur structure est cruciale, car ces espèces représentent potentiellement les principaux agents toxiques impliqués dans les amyloïdoses.

#### **1.4.3 Les oligomères qui précèdent la formation des fibres et des protofibrilles : des agrégats non structurés**

Suite à l'isolation et à la caractérisation de protofibrilles, des études basées sur la réticulation photo-induite de protéines non modifiées (PICUP) ont permis d'identifier d'autres espèces oligomériques qui semblent précéder leur formation (Bitan et al., 2001; Bitan et al., 2003). Il a été démontré que les formes de 40 et de 42 résidus du peptide  $\beta$ -amyloïde peuvent toutes deux exister sous forme d'oligomères solubles, en équilibre rapide avec la forme monomérique. Ces oligomères semblent être formés de 2 à 4 molécules pour l' $A\beta_{1-40}$  et de 5 à 6 molécules pour l' $A\beta_{1-42}$ . En outre, les mesures de dichroïsme circulaire (CD) suggèrent qu'ils sont relativement désorganisés (Bitan et al., 2003). L'intérêt pour ces oligomères de faibles masses moléculaires est devenu particulièrement grand à partir du moment où des espèces du même type ont été identifiées dans des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Roher et al., 1996) ainsi que dans les lysats et milieux conditionnés de cellules exprimant la protéine précurseur de l'amyloïde (Podlisny et al., 1995; Walsh et al., 2000).

#### **1.4.4 Agrégation de protéines globulaires par le biais d'un dépliement partiel**

Il est généralement accepté qu'une protéine globulaire doit se déplier, ne serait-ce que partiellement, avant de s'auto-assembler sous forme de fibres amyloïdes (Kelly, 1998; Dobson, 1999; Uversky et Fink, 2004). Une grande quantité de données expérimentales supporte cette hypothèse. Par exemple, les protéines globulaires ont une plus grande propension à s'agréger dans des conditions qui induisent leur dénaturation partielle, tels la température élevée, la pression élevée, le pH faible ou des concentrations modérées de solvants organiques (Guijarro et al., 1998; Chiti et



al., 2000; Ferrao-Gonzales et al., 2000; Villegas et al., 2000; Gosal et al., 2005). De plus, pour des variants familiaux de certaines maladies dans lesquelles les protéines impliquées dans l'agrégation adoptent normalement une conformation repliée, il a été établi que la déstabilisation de la conformation native est le mécanisme principal par lequel les mutations naturelles médient leur pathogénicité (Raffen et al., 1999; Canet et al., 2002; Hammarstrom et al., 2002).

Par ailleurs, les ligands et autres espèces (comme les anticorps) qui stabilisent l'état natif suite à leur liaison à la protéine peuvent considérablement réduire la propension de la protéine à s'agréger (Chiti et al., 2001; Sacchettini et Kelly, 2002; Dumoulin et al., 2003; Ray et al., 2005). Ce sont ces observations qui ont inspiré la recherche d'un composé pharmaceutique pouvant se lier de façon spécifique à la forme native tétramérique de la transthyrétine, afin de traiter les maladies associées à cette protéine (Sacchettini et Kelly, 2002).

#### **1.4.5 Agrégation de protéines globulaires via la formation d'oligomères de conformation native**

Malgré le fait que l'hypothèse du changement conformationnel apparait comme étant la manière la plus appropriée de décrire la formation de fibres amyloïdes à partir de protéines globulaires, certaines observations suggèrent que dans certains cas, le changement conformationnel majeur associé à la formation de fibres amyloïdes ne se produirait qu'après une étape initiale d'agrégation. Pour ne citer qu'un exemple, la formation de fibres amyloïdes par l'insuline à bas pH est précédée par une étape d'oligomérisation au cours de laquelle la structure hélicoïdale native est presque entièrement conservée. Ce n'est que plus tard au cours du processus que des agrégats riches en feuillets- $\beta$  rappelant la morphologie des protofibrilles amyloïdes apparaissent (Bouchard et al., 2000).

De toute évidence, les formes partiellement ou complètement dépliées des protéines globulaires sont plus susceptibles de s'agréger que les conformations natives. Cependant, dans certaines situations (particulièrement celles qui se rapprochent des conditions physiologiques), le fait que la population de polypeptides à l'état natif est beaucoup plus nombreuse peut faire en sorte que cette population joue un rôle important dans l'initiation d'un processus d'agrégation qui sera significatif au cours de la lente évolution des maladies amyloïdes.

## **1.5 Facteurs qui influencent la formation de fibres amyloïdes**

### **1.5.1 La séquence : hydrophobicité, charge et structure secondaire**

Un facteur déterminant pour l'agrégation d'une chaîne polypeptidique nativement dépliée est l'hydrophobicité de ses chaînes latérales. Les substitutions d'acides aminés dans des régions cruciales de la séquence (des régions impliquées dans la nucléation de l'agrégation) peuvent modifier le potentiel d'agrégation de la séquence entière lorsque ces substitutions modifient l'hydrophobicité locale (Otzen et al., 2000; Chiti et al., 2002; Wurth et al., 2002). De plus, certains éléments indiquent que les séquences de protéine ont évolué afin d'éviter les regroupements de résidus hydrophobes. Par exemple, les groupes de trois résidus hydrophobes consécutifs ou plus sont moins fréquents que ce à quoi on pourrait s'attendre en absence d'une sélection naturelle (Schwartz et al., 2001).

Un autre facteur important dans l'agrégation est la charge : une charge nette globalement ou localement élevée peut empêcher l'auto-assemblage (Chiti et al., 2002; Schmittschmitt et Scholtz, 2003). Par exemple, une étude s'est intéressée à l'effet de substitutions d'acides aminés simples sur la propension à s'agréger de l'acylphosphatase dénaturée dans le trifluoroéthanol (Chiti et al., 2002). Tandis que les mutations diminuant la charge nette positive résultaient en une formation accélérée d'agrégats riches en feuillets- $\beta$  liant le rouge Congo et la ThT, les mutations augmentant la charge nette positive avaient l'effet inverse. Il a également été rapporté

que l'agrégation de polypeptides peut être facilitée par l'interaction avec des macromolécules hautement chargées (Konno, 2001; Fandrich et Dobson, 2002; Giasson et al., 2003). Cette observation semble confirmer l'importance de la charge pour l'agrégation des protéines.

Des comparaisons, effectuées à l'aide d'importantes bases de données, entre des protéines nativement dépliées et des protéines nativement repliées, ont démontré que les protéines nativement dépliées contiennent moins de résidus hydrophobes ainsi que des charges nettes plus élevées que les protéines nativement repliées (Uversky, 2002). Ces propriétés contribuent certainement à réduire l'amyloïdogénicité des protéines nativement dépliées pour éviter l'agrégation dans des conditions physiologiques normales.

En plus de la charge et de l'hydrophobicité, une faible prédisposition à former des structures en hélices- $\alpha$  et une forte propension à former des structures en feuillets- $\beta$  peuvent favoriser l'assemblage en fibres amyloïdes (Broome et Hecht, 2000; Villegas et al., 2000; Chiti et al., 2002). Les motifs contenant une alternance entre résidus hydrophobes et résidus hydrophiles sont moins fréquents dans les protéines naturelles que ce qui serait attendu sur une base aléatoire. Ceci suggère que la sélection naturelle a défavorisé ce type de séquence qui a tendance à promouvoir la formation de structures riches en feuillets- $\beta$  (Broome et Hecht, 2000). De plus, il a été suggéré que la conservation des résidus proline au sein de la superfamille de la fibronectine de type III ainsi que la haute conservation des résidus glycine chez les acylphosphatases résultent de la faible capacité de ces résidus à former des structures en feuillets- $\beta$ , inhibant ainsi l'agrégation (Steward et al., 2002; Parrini et al., 2005).

### **1.5.2 Concentration en protéines**

L'agrégation est une réaction dont la vitesse est très sensible à l'augmentation de la concentration en protéine. *In vitro*, une augmentation de la concentration en protéine engendre un raccourcissement de la phase de latence et une hausse de la vitesse

d'élongation des fibres (Fung et al., 2003; Kodaka, 2004). Il a aussi été démontré qu'une augmentation de la concentration *in vivo* d'une protéine peut promouvoir son agrégation. Par exemple, les niveaux d'expression de certaines protéines amyloïdogéniques comme l'A $\beta$  et l' $\alpha$ -synucléine sont étroitement associés à la progression de la maladie d'Alzheimer et de la maladie de Parkinson respectivement (Lansbury et Lashuel, 2006).

### 1.5.3 Encombrement par les macromolécules

Dans une cellule eucaryote typique, les ARNs et autres biopolymères occupent 30% du volume, une situation nommée *encombrement macromoléculaire*. La conséquence directe de l'encombrement est qu'il reste peu d'espace disponible pour l'ajout de macromolécules supplémentaires, ce qui a pour effet de réduire l'entropie configurationnelle et donc d'augmenter l'énergie libre de ces macromolécules (Ellis et Minton, 2006). Par conséquent, l'agrégation est favorisée théoriquement, tant du point de vue cinétique que thermodynamique (Ellis et Minton, 2006). Il a été démontré que l'encombrement moléculaire accélère l'agrégation d'un grand nombre de protéines *in vitro*. Ceci porte à croire que les processus naturels d'agrégation pourraient être encore plus favorisés que ce que les études réalisées dans des tubes à essai laissent présager (Ellis et Minton, 2006).

### 1.5.4 Interaction avec des composés naturels

L'encombrement n'est pas le seul mécanisme par lequel les macromolécules influencent l'agrégation des protéines dans les organismes vivants. Certaines macromolécules comme les glycosaminoglycanes (GAGs), la protéine amyloïde sérique, l'apolipoprotéine E et les fibres de collagène sont fréquemment associées aux dépôts amyloïdes extraits de patients (Cotman et al., 2000; Carter, 2005; Kakuyama et al., 2005; Relini et al., 2006; Liko et al., 2007). Elles peuvent aussi modifier la propension des fibres amyloïdes à la dissociation et à la dégradation protéolytique (Gupta-Bansal et al., 1995; Tennent et al., 1995; Yamaguchi et al., 2003; Soderberg et



al., 2005). Les membranes biologiques jouent également un rôle catalytique dans l'agrégation d'un grand nombre de protéines amyloïdogéniques (Weber et al., 2012). Ces effets ne sont pas causés exclusivement par des macromolécules. En effet, il est reconnu que les ions métalliques, particulièrement les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ , accélèrent la formation de fibres amyloïdes à partir du peptide  $\text{A}\beta$  (Bush, 2003; Weber et al., 2012), de l' $\alpha$ -synucléine (Uversky et al., 2001) et de la  $\beta$ 2-microglobuline (Eakin et al., 2006).

### 1.5.5 Vieillessement

La plupart des amyloïdoses apparaissent tard dans la vie. Le vieillissement semblerait favoriser l'événement de l'agrégation protéique et jouer un rôle déterminant dans l'apparition des conditions pathologiques liées à cette agrégation. Des données expérimentales qui font le lien entre vieillissement et agrégation dans des modèles animaux ont été recueillies (Morley et al., 2002; Cohen et al., 2006; Paz Gavilan et al., 2006). Au cours de la vie d'un être humain, une série d'altérations biologiques favorisant l'agrégation se produisent. Ces altérations incluent un déclin dans l'activité du protéasome, du lysosome et des chaperones ainsi qu'une réduction de l'efficacité qu'ont les machineries cellulaires à répondre au stress, au débalancement de l'homéostasie des ions métalliques, à la diminution des défenses antioxydantes, *etc.* (Keller et al., 2002; Soti et Csermely, 2003; Paz Gavilan et al., 2006).

### 1.5.6 Stress oxydatif et modifications post-traductionnelles

Un autre facteur biologique qui peut déclencher l'agrégation *in vivo* est le stress oxydatif. Ce dernier est défini comme un déséquilibre entre la génération d'espèces oxydantes et les systèmes antioxydants, en faveur des espèces oxydantes. Les dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species, ROS*) et les dérivés réactifs de l'azote (*reactive nitrogen species, RNS*) sont parmi les formes les plus communes d'oxydants en biologie et sont générés en tant que sous-produits du métabolisme normal et/ou par des stimuli exogènes comme les rayons UV (Andreyev et al., 2005). Le stress



oxydatif peut endommager tous les polymères biologiques, dont les protéines. Les chaînes latérales de certains acides aminés peuvent être rapidement modifiés par les dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote. En outre, le stress oxydatif peut mener à la formation de molécules électrophiles qui pourront par la suite réagir avec les chaînes latérales nucléophiles de certains résidus (Houglund et al., 2013). À travers ces deux voies, le stress oxydatif peut engendrer une variété de modifications post-traductionnelles (PTMs) non enzymatiques susceptibles de favoriser l'agrégation des protéines.

Peu d'attention a été accordée au rôle des PTMs non enzymatiques (appelées aussi modifications chimiques) sur la formation de fibres amyloïdes *in vitro* et *in vivo*. Pourtant, une variété surprenante de modifications chimiques peuvent affecter les protéines, certaines étant relativement bénignes tandis que d'autres semblent avoir un effet majeur (**Tableau 1.2**). Une liste non exhaustive de ces modifications inclut la désamidation, l'oxydation, la  $\beta$ -élimination, la nitration, la glycation, l'addition de Michael, la racémisation, le clivage d'une liaison peptidique et différentes réactions de réticulation. Le rôle exact de ces modifications sur la formation de fibres amyloïdes *in vivo* n'est toujours pas bien compris. Plusieurs échantillons *ex vivo* de dépôts amyloïdes contiennent des protéines qui ont subi des modifications chimiques, mais il est difficile d'établir une relation de cause à effet. Effectivement, les modifications chimiques peuvent avoir déclenché la formation de fibres amyloïdes, mais comme ces structures ont une grande longévité, la présence de modifications peut simplement refléter leur longue durée de vie (Nilsson et Dobson, 2003; Nilsson, 2008).

L'oxydation des chaînes latérales de protéines est extrêmement répandue et est bien caractérisée. Elle joue un rôle majeur dans le vieillissement et il est probable qu'elle contribue à la formation des fibres amyloïdes. Les résidus Arg, Cys, Gln, Glu, His, Lys, Met, Pro, Thr, Tyr et Trp sont tous susceptibles d'être oxydés et il a été

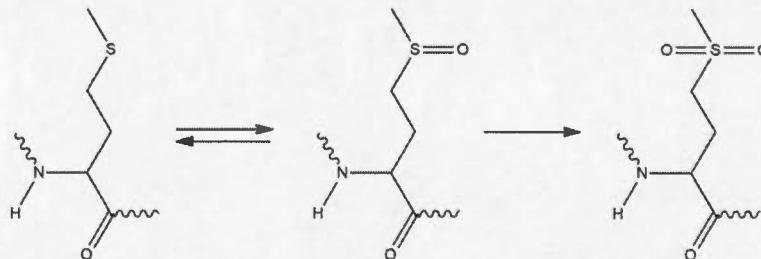
démontré que cette oxydation est impliquée dans le vieillissement protéique (Soskic et al., 2008).

**Tableau 1.2** Modifications post-traductionnelles non enzymatiques qui peuvent jouer un rôle dans la formation de fibres amyloïdes.

Résidu	Modification	Référence
Asn	Désamidation	(Dunkelberger et al., 2012)
Asp	Racémisation	(Tomiya et al., 1994)
Arg	Glycation, formation de produits terminaux de la glycation (PTGs), incluant la génération de réticulation	(Miyata et al., 1996)
Cys	$\beta$ -élimination, formation de disulfure incorrecte	(Shimizu, 2006)
Gln	Désamidation, formation d'acide pyroglutamique	(Dunkelberger et al., 2012)
His	Addition de Michael de 4-hydroxy-2-nonenal produit à la suite du dommage oxydatif de membranes lipidiques	(Butterfield et al., 2002)
Lys	Glycation, formation de produits terminaux de la glycation (PTGs), incluant la génération de réticulation	(Miyata et al., 1996)
Met	Oxydation	(Chan et al., 2015)
Ser	Racémisation	(Kubo et al., 2003)
Tyr	Oxydation, incluant la génération de dityrosine réticulée, nitration	(Giasson et al., 2000)

Une quantité innombrable de modifications oxydatives des protéines ont été rapportées à ce jour. Celles qui ont été identifiées comme ayant un impact majeur sur la formation de fibres amyloïdes sont l'oxydation des chaînes latérales de la

méthionine et l'oxydation des résidus aromatiques, particulièrement la tyrosine. L'oxydation de la chaîne latérale de la méthionine peut engendrer la formation de deux produits (**Fig. 1.4.**). La première oxydation, qui mène au sulfoxyde, est réversible et peut se produire dans des conditions douces. La deuxième oxydation, qui mène à la sulfone, requiert des conditions dures et n'est généralement pas réversible. L'oxydation en sulfoxyde se produit facilement et il s'agit d'une modification non enzymatique commune. L'oxydation modifie l'hydrophobicité et la forme de la chaîne en introduisant un atome d'oxygène polaire. L'effet de l'oxydation de la méthionine sur la formation de fibres amyloïdes à partir du peptide A $\beta$  et de l' $\alpha$ -synucléine a été étudié (Hou et al., 2002; Palmblad et al., 2002; Hokenson et al., 2004; Ahmed et al., 2005). L'oxydation de Met<sup>35</sup> du peptide A $\beta$  ainsi que des résidus méthionine de l' $\alpha$ -synucléine ralentit la formation de fibres amyloïdes (Hokenson et al., 2004).

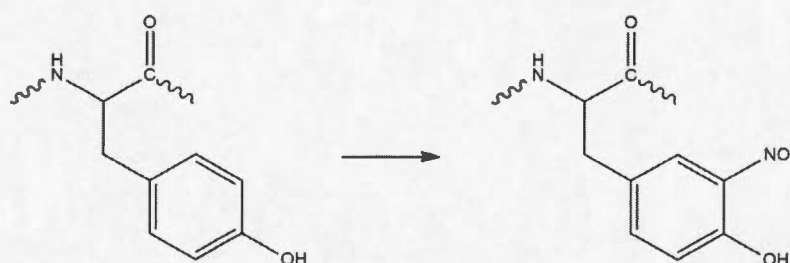


**Figure 1.4** L'oxydation de la méthionine peut mener au sulfoxyde, et dans des conditions plus dures, à la sulfone.

La tyrosine peut subir un certain nombre de modifications chimiques dont l'oxydation en 3,4-dihydroxyphénylalanine, la nitration en 3-nitrotyrosine (**Fig. 1.5.**), la chlorination menant à la 3,5-dichlorotyrosine et la formation de réticulation Tyr-Tyr (Volkin et al., 1995; Stadtman, 2001; Ahmed et al., 2005; Soskic et al., 2008). La nitration de résidus Tyr de l' $\alpha$ -synucléine a été mise en évidence et il a été suggéré que ces modifications affectent la stabilité des fibres et/ou la cinétique de formation



des fibres (Giasson et al., 2000; Horiguchi et al., 2003; Norris et al., 2003). De plus, des études *in vitro* ont démontré qu'une réticulation d' $\alpha$ -synucléine se produit à la suite d'une exposition à des agents de nitration et qu'elle nécessite la présence de résidus Tyr. Cette réticulation pourrait perturber la stabilité de l' $\alpha$ -synucléine et favoriser la formation de structures filamenteuses (Giasson et al., 2000).



**Figure 1.5** Nitration de la tyrosine en 3-nitrotyrosine.

Le dommage oxydatif peut affecter les protéines indirectement en produisant des espèces qui réagissent avec des chaînes latérales vulnérables. La production de 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE) par le biais du stress oxydatif est un exemple de ce type de réaction qui a une influence sur la formation de fibres amyloïdes. Le HNE est produit lorsque des membranes lipidiques contenant des chaînes polyinsaturées omega-6 subissent un stress oxydatif. Il a été démontré que ce composé peut modifier plusieurs chaînes latérales d'histidine du peptide A $\beta$  par l'intermédiaire d'additions de Michael (Liu et al., 2008). Une étude biophysique a révélé que le peptide A $\beta$  modifié par le HNE adopte une conformation qui lui procure une plus grande affinité pour les membranes, ce qui serait favorable à la formation de fibres amyloïdes (Liu et al., 2008). Des effets différents ont été observés dans le cas de l' $\alpha$ -synucléine (Qin et al., 2007). L'incubation de l' $\alpha$ -synucléine avec le HNE a engendré des modifications covalentes par la formation d'adduits de Michael et jusqu'à 6 sites ont été modifiés par molécule d' $\alpha$ -synucléine. Ces modifications ont eu pour effet d'altérer la

conformation de la protéine et d'inhiber la formation de fibres amyloïdes, menant plutôt à son assemblage en oligomères compacts. Ces oligomères sont toxiques pour des cellules mésencéphaliques en culture (Qin et al., 2007).

Les échantillons *ex vivo* de dépôts amyloïdes contiennent très fréquemment des protéines modifiées de façon post-traductionnelle, mais l'effet potentiel de ces modifications sur la formation de fibres amyloïdes reste inconnu. La problématique dans le cadre d'études *in vivo* est de déterminer si les PTMs se sont produites avant ou après l'assemblage en fibres amyloïdes. Une meilleure compréhension du rôle des PTM pourrait mener à de nouvelles approches thérapeutiques (Rochet, 2007) et à une interprétation plus fiable d'études biochimiques et biophysiques *in vitro*. Le fait qu'il existe un processus de nucléation hétérogène a des implications intéressantes, puisque cela démontre qu'une petite quantité de protéine amyloïdogénique peut parfois induire la formation d'amyloïdes à partir d'une deuxième protéine. Il serait donc possible qu'une petite population de protéines modifiées post-traductionnellement promeuve la formation d'amyloïdes en s'assemblant rapidement puis en agissant comme noyau pour induire la formation d'amyloïdes à partir d'une population de protéines non modifiées (Abedini et al., 2010).

## 1.6 Pathogenèse des amyloïdoses

La présence de dépôts fibrillaires hautement organisés au niveau des organes de patients touchés par les pathologies d'amyloïdose a tout naturellement poussé la communauté scientifique à considérer que ces maladies étaient causées par ces agrégats. Par exemple, il a été démontré que les fibres amyloïdes formées à partir du peptide  $\beta$ -amyloïde sont toxiques pour des neurones en culture (Pike et al., 1991; Lorenzo et Yankner, 1994) et qu'elles engendrent la dépolarisation de leurs membranes et des altérations dans la fréquence de leurs potentiels d'action (Hartley et al., 1999). De plus, une étude a révélé que les fibres de peptide  $\beta$ -amyloïde causent une perte neuronale et une activation de la microglie lorsqu'elles sont injectées dans



le cortex cérébral de singes rhésus âgés (Geula et al., 1998). Cependant, des recherches plus récentes ont soulevé la possibilité que certains précurseurs des fibres amyloïdes, notamment des oligomères de faibles masses moléculaires ainsi que des protofibrilles structurées sont les véritables espèces pathogéniques, du moins dans le cadre des maladies neurodégénératives.

### **1.6.1 À la recherche de l'agent protéotoxique des amyloïdoses**

Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, la sévérité de la détérioration cognitive est directement corrélée avec les niveaux d'espèces de faibles masses moléculaires de A $\beta$  et non avec ceux des fibres amyloïdes (Lue et al., 1999; McLean et al., 1999; Wang et al., 1999). De plus, les souris transgéniques présentent des déficits tant au niveau des fonctions cellulaires, de la plasticité cellulaire et des fonctions cognitives bien avant l'accumulation d'une quantité significative de plaques amyloïdes (Larson et al., 1999; Moechars et al., 1999). Similairement, les changements phénotypiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer précèdent la formation de plaques amyloïdes chez la drosophile transgénique qui exprime A $\beta$ <sub>1-42</sub> et A $\beta$ <sub>1-40</sub> (Iijima et al., 2004; Crowther et al., 2005).

Un phénomène similaire a été observé dans le cadre de la maladie de Parkinson, une maladie neurodégénérative associée à la formation de dépôts intracellulaires fibrillaires, notamment des corps de Lewy, au niveau des neurones dopaminergiques de la *substantia nigra*. Les mutations liées aux formes juvénile et précoce de la maladie de Parkinson mènent à une dégradation neuronale rapide, en absence d'accumulation de corps de Lewy (Kitada et al., 1998). La surexpression de l' $\alpha$ -synucléine dans des rats transgéniques mène à une formation de dépôts intracellulaires, mais à aucune perte neuronale (Lo Bianco et al., 2002). Par contre, des souris transgéniques avec des dépôts non fibrillaires d' $\alpha$ -synucléine dans différentes régions du cerveau présentent des déficits moteurs substantiels ainsi que des pertes de neurones dopaminergiques (Masliah et al., 2000).

En outre, il a été observé que des agrégats non fibrillaires de la transthyréine sont toxiques pour des cellules neuronales dans des conditions où le tétramère natif et les fibres matures ne le sont pas (Sousa et al., 2001). De plus, les symptômes de la polyneuropathie familiale amyloïde apparaissent quand la transthyréine est déposée sous une forme agrégée mais non fibrillaire qui n'est pas colorée par le rouge Congo (Sousa et al., 2001). Il a été suggéré que des oligomères de transthyréine de faibles masses moléculaires sont responsables de la toxicité (Reixach et al., 2004).

### **1.6.2 La toxicité des agrégats préfibrillaires découle de leur nature dépliée**

Compte tenu du fait que ces agrégats préfibrillaires sont toxiques pour les cellules et qu'ils semblent être à l'origine d'au moins une partie des amyloïdoses, ils sont désormais à l'avant-plan de la recherche dans le domaine.

Malgré les différences entre les mécanismes pathogéniques qui engendrent des maladies distinctes, il apparaît que la conversion d'une protéine de son état soluble vers des formes oligomériques génère au passage un large éventail d'espèces non natives qui varient en fonction de la séquence, du temps et des conditions. Ces espèces «mal repliées» pourraient être toxiques jusqu'à un certain degré puisqu'elles exposent à leur surface un bon nombre de groupements qui sont normalement enfouis (chez les protéines globulaires) ou dispersés (chez les polypeptides hautement dépliés). Les petits agrégats ont une plus grande proportion de leurs résidus à leur surface que de plus gros agrégats (incluant les fibres amyloïdes) et sont donc plus susceptibles d'avoir une toxicité relative plus importante. Dans l'environnement encombré et hautement organisé d'un organisme vivant, il est probable qu'un oligomère mal replié déclenche des événements aberrants à la suite d'interactions avec des composantes cellulaires comme des membranes, des protéines ou d'autres macromolécules. Dans certaines circonstances, ce genre d'événement va mener au mauvais fonctionnement d'aspects cruciaux de la machinerie cellulaire, que ce soit le transport axonal, le stress oxydatif, l'équilibre ionique ou la séquestration de

protéines essentielles, menant ultimement à l'apoptose ou à d'autres formes de mort cellulaire.

Malgré le fait que les défenses naturelles contre les protéines mal repliées tentent de séquestrer et neutraliser ces espèces, il est inévitable qu'elles soient parfois incapables de prévenir tous ces événements problématiques (Dobson, 1999; Soti et al., 2005). Ceci risque de se produire lorsque certaines mutations augmentent considérablement les vitesses d'agrégation (maladies familiales), lorsque la présence d'agrégats préformés peut nucléer une agrégation encore plus importante (maladies à prions), ou lorsque la réponse des chaperones et du système ubiquitine-protéasome décline avec l'âge (formes sporadiques des maladies). La cytotoxicité médiée par les oligomères est un élément important dans les amyloïdose neurodégénératives, mais il n'est pas aussi clair que le même mécanisme est central dans la pathogenèse des amyloïdoses non neurodégénératives. Les amyloïdoses systémiques sont souvent associées à l'accumulation de très grandes quantités, parfois même des kilos, de dépôts amyloïdes dans les tissus et organes affectés (Pepys, 2001). De toute évidence, la présence de ces dépôts au niveau d'organes vitaux perturbe l'architecture des tissus et il est probable qu'elle est le facteur principal dans la pathogenèse de certaines de ces amyloïdoses non neurodégénératives (Pepys, 2001). Cependant, il a quand même été suggéré que les espèces oligomériques pourraient avoir un rôle plus important que l'accumulation de fibres dans le cadre de ces amyloïdoses systémiques (Sousa et al., 2001; Merlini et Bellotti, 2003). L'élucidation du mécanisme par lequel les fibres amyloïdes causent le dommage tissulaire est un enjeu important dans le cadre d'approches thérapeutiques, mais la stratégie optimale semble être de prévenir l'agrégation ou même la production des protéines amyloïdogéniques avant même qu'elles puissent former des dépôts dommageables.



### 1.7 L'amyloïdose à chaînes légères

L'amyloïdose à chaînes légères (AL) est une maladie liée au mauvais repliement des protéines qui est caractérisée par le dépôt extracellulaire de chaînes légères d'immunoglobulines sous la forme de fibres amyloïdes (Buxbaum, 2003). Les immunoglobulines sont des protéines formées de deux chaînes légères (LC) et de deux chaînes lourdes (HC). En temps normal, ces quatre chaînes sont assemblées pour former un hétérotétramère, forme sous laquelle elles sont ensuite sécrétées par les lymphocytes B. Toutefois, dans le cadre de la pathologie d'AL, une population monoclonale de lymphocyte B produit une grande quantité de LC qui sont ensuite sécrétées dans la circulation sans avoir été préalablement associées aux HC. Le dimère LC-HC est très stable et la perte de cette interaction peut rendre la LC instable (Stevens et al., 1980). De plus, il semblerait que des mutations somatiques puissent rendre les LC plus instables (Stevens et al., 1995; Wall et al., 1999), ce qui favoriserait leur mauvais repliement et la formation de fibres amyloïdes.

L'AL est la seule pathologie hématologique qui est associée à un désordre du repliement protéique. L'incidence de la maladie est de huit cas par million de personnes par année (Gertz et al., 1999), soit la même incidence que le lymphome de Hodgkin. L'âge médian des patients atteints est de 65 ans. L'AL est légèrement plus fréquente chez l'homme que chez la femme (Kyle et Greipp, 1983). Elle est caractérisée par la prolifération anormale d'un clone de lymphocyte B dans la moelle osseuse. Ces lymphocytes B sécrètent de grandes quantités de chaînes légères d'anticorps monoclonaux. Elles sont sécrétées dans la circulation et excrétées en grande quantité dans l'urine. Une fois en circulation, ces LC subissent un mauvais repliement et forment des fibres amyloïdes composées (dans la plupart des cas d'AL) par des domaines variables N-terminaux des chaînes légères (Olsen et al., 1998). Les dépôts amyloïdes dans l'espace extracellulaire de multiples organes vitaux sont associés à leur dégénérescence. Le rein est l'organe le plus fréquemment touché (Gertz et Kyle, 1990), suivi du cœur (Kyle et Gertz, 1995) et du foie (Gertz et Kyle,

1997). Des atteintes gastro-intestinale, pulmonaire et du système nerveux périphérique ont également été observées. L'AL peut aussi s'infiltrer au niveau de la langue, des glandes salivaires, des muscles squelettiques, des articulations, des ligaments et de la peau (Sezer et al., 2000). La maladie est insidieuse, elle progresse de façon implacable et est uniformément létale, avec une médiane de survie d'environ 12 à 18 mois et un taux de survie après 10 ans de 5 % (Kyle et al., 1986; Gertz et Kyle, 1989; Kyle et al., 1999).

### **1.7.1 Myélome multiple et amyloïdose à chaînes légères**

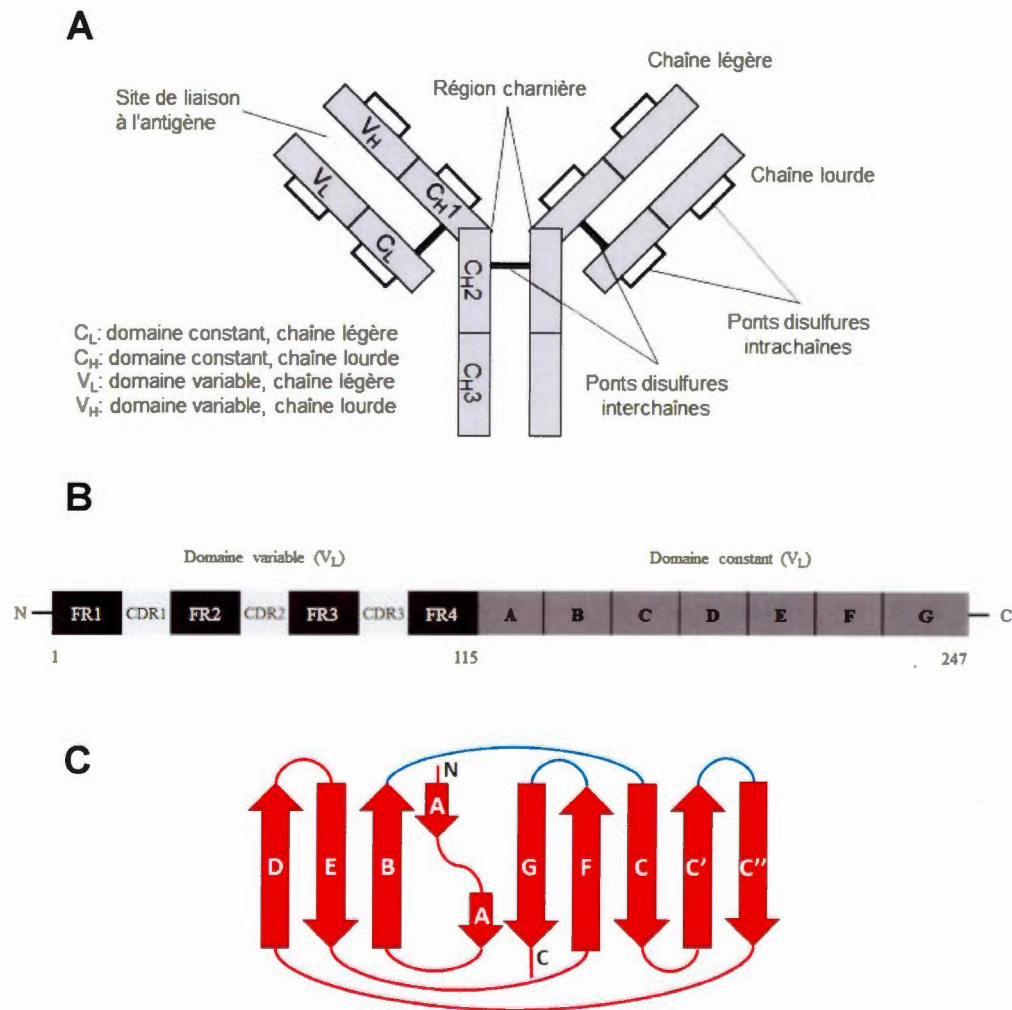
Le myélome multiple (MM) est un cancer hématologique caractérisé par la prolifération anormale de lymphocytes B dans la moelle osseuse. Il peut engendrer des lésions osseuses, de l'hypercalcémie, de l'insuffisance rénale et de l'anémie. Les lymphocytes B sécrètent de grandes quantités de chaînes légères d'anticorps dans la circulation. Comme pour l'AL, ces chaînes légères sont sécrétées dans la circulation et excrétées dans l'urine en grandes quantités. Contrairement à ce qui se produit dans l'AL, aucun dépôt amyloïde n'est retrouvé chez de nombreux patients souffrant de MM. Les chaînes légères impliquées dans le MM ne sont donc pas considérées comme amyloïdogéniques et sont utilisées comme contrôle dans les études sur l'AL. Cependant, une certaine proportion des patients MM (de 10 à 15%) développent également une amyloïdose à chaînes légères (Rajkumar et al., 1998).

### **1.7.2 Structure des anticorps**

Les anticorps sont composés de deux chaînes légères identiques ainsi que de deux chaînes lourdes identiques liées entre elles par des ponts disulfures (**Fig. 1.6A.**). Une HC a un domaine variable et trois domaines constants différents, tandis qu'une LC possède un domaine variable et un seul domaine constant. La variabilité de séquence des anticorps provient de la jonction combinatoire des segments géniques variables (V) et des segments géniques de jonction (J), qui permet de générer au moins 90 000 HC différentes et 3000 LC différentes (Brändén et Tooze, 1999). De plus,



l'hypermutation somatique des gènes des régions variables a pour effet d'améliorer l'affinité de l'anticorps pour l'antigène, et diversifie encore davantage la séquence de l'anticorps. Une protéine LC est composée d'un domaine variable N-terminal et d'un domaine constant C-terminal. Il existe deux grandes familles de domaine variable de chaînes légères : kappa ( $\kappa$ ) et lambda ( $\lambda$ ). Les domaines variables de LC ne sont pas variables uniformément sur toute leur longueur. En effet, trois petites régions, les régions hypervariables ou régions déterminant la complémentarité (CDR), présentent une variabilité beaucoup plus importante que le reste du domaine variable. La taille et la séquence de ces régions varient entre les différents isotypes. Elles sont responsables de la spécificité de l'interaction antigène-anticorps. Le reste du domaine variable est formé de quatre domaines charpentes (domaines FR) qui possèdent des séquences d'acides aminés homologues, particulièrement au sein même des familles kappa et lambda (Brändén et Tooze, 1999) (**Fig. 1.6B.**).



**Figure 1.6** Représentation schématique de la structure de l'anticorps (A), des régions de la chaîne légère (B) et de la structure du domaine variable (C).

(A) Structure de base d'un anticorps. Les chaînes légères et les chaînes lourdes sont liées entre elles par des ponts disulfures. (B) Représentation schématique d'une chaîne légère d'anticorps. FR = domaines charpentes (C) Représentation schématique du domaine variable de chaîne légère. Les brins- $\beta$  sont représentés par des flèches. Les régions correspondant aux régions déterminant la complémentarité (CDR) sont représentées en bleu.

La structure typique d'un domaine variable consiste en deux feuillets- $\beta$  antiparallèles compactés ensemble et liés entre eux par un pont disulfure. Sa configuration ressemble à une forme de tonneau- $\beta$  avec motif en clé grecque constitué de 9 brins- $\beta$  (A, B, C, C', C'', D, E, F et G). Le brin A est l'extrémité N-terminale, tandis que le G représente l'extrémité C-terminale. Les brins C, C', F et G forment le feuillet- $\beta$  qui interagit avec la chaîne lourde. Les CDRs forment trois boucles non structurées entre les acides aminés 24-34, 50-56 et 89-95. Elles contiennent la séquence qui va reconnaître l'antigène (**Fig. 1.6C**).

### 1.7.3 Surreprésentation de lignées germinales et mutations somatiques

Il existe une diversité de gènes de lignée germinale à partir desquels peuvent être formées les domaines variables de chaînes légères, soit 40 gènes kappa et 33 gènes lambda. Dans la pathologie d'AL, il existe une surreprésentation de certains gènes de lignée germinale. Les gènes surreprésentés sont  $\kappa$ I,  $\lambda$ I,  $\lambda$ II,  $\lambda$ III et  $\lambda$ VI (Poshusta et al., 2009). Comme nous l'avons mentionné plus tôt, le processus d'hypermutation somatique ajoute à la complexité de l'AL car chaque patient possède une séquence protéique unique. En effet, cette protéine est le résultat d'une combinaison de différents gènes de lignées germinales, mais aussi de mutations somatiques à différentes positions dans la protéine et à différents acides aminés. Les variations au sein de ces séquences pourraient expliquer pourquoi les LCs impliquées dans l'AL n'ont pas toutes la même propension à former des espèces toxiques et des fibres amyloïdes. Elles pourraient aussi expliquer pourquoi les organes affectés chez les patients atteints d'AL ne sont pas toujours les mêmes. Dans l'AL, la lignée  $\lambda$  est surreprésentée ( $\lambda:\kappa = 3:1$ ) en comparaison avec des individus sains ou avec des patients atteints de myélome multiple ( $\lambda:\kappa = 1:2$ ) (Kyle et Gertz, 1995). De plus, il existe une surreprésentation de certains gènes au sein même de la lignée germinale  $\lambda$ . Trois études ont montré que les donneurs de gènes de lignées germinales utilisés pour les domaines variables impliqués dans l'AL comprennent V $\lambda$ II 2a2, V $\lambda$ III 3r, V $\lambda$ VI 6a, et V $\lambda$ I O18/O8 (Comenzo et al., 2001; Abraham et al., 2003; Prokayeva et al.,



2007). Il a aussi été démontré que 30% des gènes de domaine variable d'AL utilisent le donneur de lignée germinale V $\lambda$ VI 6a (Comenzo et al., 2001). De plus, la lignée germinale  $\lambda$ 6a est exprimée presque exclusivement chez les patients souffrant d'AL et non dans le répertoire de LC normales (Solomon et al., 1982; Ozaki et al., 1994; Comenzo et al., 2001; Perfetti et al., 2002; Abraham et al., 2003).

#### **1.7.4 Influence de la stabilité thermodynamique sur l'amyloïdogénicité**

Des études basées sur des domaines variables provenant de patients atteints d'AL ont montré que les mutations qui réduisent la stabilité thermodynamique du domaine variable sont plus favorables à la formation de fibres amyloïdes que d'autres mutations. Ceci est probablement dû au fait que ces mutations entraînent l'adoption d'états partiellement dépliés (Hurle et al., 1994; Stevens et al., 1995; Wetzel, 1997). D'autres études ont montré que les protéines impliquées dans l'AL sont moins stables que leurs équivalents non amyloïdogéniques, comme les protéines du myélome multiple (Wall et al., 1999; Kim et al., 2000). La conclusion principale de ces études est que les mutations somatiques ont un effet déstabilisant sur les protéines AL, ce qui fait qu'elles requièrent moins d'énergie pour se dénaturer partiellement (Hurle et al., 1994; Stevens et al., 1995; Wetzel, 1997).

Comme la lignée germinale  $\lambda$ 6a est exprimée presque exclusivement chez les patients souffrant d'AL et qu'elle est rarement retrouvée dans le répertoire des chaînes légères normales (Comenzo et al., 2001; Abraham et al., 2003; Prokaeva et al., 2007), une hypothèse a été émise selon laquelle la protéine de cette lignée germinale serait aussi instable que les protéines AL. Cependant, des essais ont révélé que la protéine de la lignée germinale  $\lambda$ 6a est plus stable que Wil, une protéine de la même lignée qui présente 11 mutations somatiques (del Pozo Yauner et al., 2008). La protéine de la lignée germinale  $\lambda$ 6a avait aussi une cinétique de fibrillation beaucoup plus lente que Wil.



D'autres groupes ont étudié la formation de fibres amyloïdes à partir de différentes protéines de l'AL et du myélome multiple. Jto (une protéine du myélome multiple) et Wil (une protéine AL) sont deux domaines variables de chaînes légères de la lignée  $\lambda 6a$  qui diffèrent au niveau de 19 acides aminés (**Fig. 1.7.**).

$\lambda 6a$	NFMLTQPHS-	VSESPGKTVT	ISCTRSSGS	IASNYVQ	WYQQRPGSSP	TTVIYEDNQR
Wil	..L.....-	.....	.....	..N...H	.....	....F..DH.
Jto	....N.....-	.....	.....N	.D.....	.....A.	I.....

$\lambda 6a$	PSGVPDRFSG	SIDSSNSAS	LTISGLKTED	EADYYCQSYD	SSN----	-----
Wil	.....	.V.T.....	.....	.....	HN.QVF	GGGTKLTVLG
Jto	.....A.	...R.....	.....	.....	AR.VVF	GGGTRLTVLG

**Figure 1.7** Comparaison des séquences en acides aminés des protéines Wil et Jto avec le produit prédit pour le gène de la lignée germinale  $\lambda 6a$ .

Jto et Wil ont tous deux formé des fibres amyloïdes à 37°C, pH 7.5 (Wall et al., 1999). La cinétique de formation de fibres était plus lente pour Jto que pour Wil et les fibres formées par Jto apparaissaient plus courtes et rigides que celles formées par Wil. Certaines interactions électrostatiques peuvent affecter la formation de fibres et elles sont parfois essentielles à la stabilité des chaînes légères. Des interactions électrostatiques entre les résidus Asp29 et Arg68 de Jto ont été mises en évidence, alors que la protéine Wil possède des acides aminés neutres à ces positions (Wall et al., 2004). Pour tester l'importance de cette interaction électrostatique, des mutations ont été faites à Jto pour introduire les acides aminés neutres (de Wil) à ces positions (JtoD29a et JtoR68S). La stabilité thermodynamique des mutants JtoD29a et JtoR68 était la même que celle de la protéine sauvage. Toutefois, la vitesse de fibrillation était beaucoup plus rapide pour JtoR68 que pour la protéine non mutée. La structure cristalline déterminée par diffraction des rayons X de ce mutant a révélé plusieurs différences au niveau des chaînes latérales en comparaison avec Jto et JtoD29a. Ces

différences ont altéré le potentiel électrostatique de surface et ont augmenté la surface hydrophobe exposée au solvant (Wall et al., 2004). Ces résultats mettent en évidence des caractéristiques structurales essentielles comme les interactions électrostatiques qui contribuent à la stabilité et à l'amyloïdogénicité des protéines impliquées dans l'AL.

### **1.7.5 Influence des sels sur l'amyloïdogénèse des chaînes légères**

La présence d'ions peut grandement affecter la formation de fibres amyloïdes. La série Hofmeister est un outil qui permet d'évaluer l'impact de sels sur la stabilité d'une protéine. Elle établit un classement des ions selon leur habileté à stabiliser ou déstabiliser une protéine (Cacace et al., 1997; Zhang et al., 2005). Une étude a utilisé le domaine variable amyloïdogénique AL-12 pour déterminer l'impact d'anions et de cations physiologiquement pertinents (de la série Hofmeister) sur la stabilité et l'amyloïdogénicité de protéine AL. La présence de différents sels n'a pas affecté la structure secondaire de la protéine, mais a contribué à augmenter sa stabilité thermodynamique. De plus, tous les sels ont favorisé la formation de fibres amyloïdes. Les ions  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  ont eu les plus grands impacts sur la fibrillation (Sikkink et Ramirez-Alvarado, 2008). Plus récemment, une analyse systématique de l'effet de différentes concentrations de NaCl sur la formation de fibres amyloïdes a été effectuée. L'étude s'est intéressée à la fibrillation de deux chaînes légères similaires (AL-09 et AL-103) en présence de NaCl. La protéine AL-09 formait rapidement des fibres sur une large gamme de concentrations de sels. Par contre, la vitesse de fibrillation de la LC amyloïdogénique AL-103 (90% d'homologie de séquence avec AL-09) était inversement proportionnelle à la concentration en NaCl (Martin et Ramirez-Alvarado, 2010). D'autres études portant sur différentes chaînes légères seront nécessaires afin de comprendre l'impact des sels sur la formation de fibres amyloïdes à partir de ces protéines.

### **1.7.6 Effet de la concentration et de la dimérisation des domaines variables de LC sur la cinétique de formation de fibres amyloïdes**

La concentration en protéine est un facteur qui peut influencer la cinétique de formation de fibres amyloïdes des chaînes légères. La protéine SMA est un domaine variable de chaîne légère provenant d'un patient atteint d'AL et LEN est un domaine variable de chaîne légère provenant d'un patient atteint de myélome multiple. Il a été démontré que des solutions de LEN de faibles concentrations affichent des cinétiques de fibrillation plus rapides que les solutions de concentrations plus élevées (Souillac et al., 2002). À des concentrations élevées, LEN s'assemble en espèces oligomériques «off-pathway» avant de former des fibres amyloïdes (Souillac et al., 2003). À des concentrations faibles, les espèces «off-pathway» sont absentes (Souillac et al., 2002). Ce phénomène pourrait s'expliquer par les mécanismes suivants : la forme monomérique de LEN est plus amyloïdogénique que le dimère et de faibles concentrations favorisent le monomère. À l'opposé, à fortes concentrations, l'homodimérisation est favorisée et mène à la formation d'agrégats amorphes («off-pathway») qui sont en compétition avec la voie de formation de fibres amyloïdes (Powers et Powers, 2008). Il a été rapporté que des domaines variables de LC ont tendance à former des dimères de façon dépendante de la concentration (Stevens et al., 1980; Kolmar et al., 1994; Souillac et al., 2002; Qin et al., 2007; Baden et al., 2008) et que cette dimérisation est associée à des cinétiques de fibrillation plus lentes. L'effet de l'équilibre monomère/dimère a été étudié pour les domaines variables de la lignée  $\kappa 1$  (Baden et al., 2008), mais il n'a pas été étudié pour la lignée  $\lambda 6$  jusqu'à maintenant.

L'ajout d'un noyau de fibres préformées à des solutions de protéines solubles peut accélérer la cinétique de formation de fibres amyloïdes en réduisant la longueur de la phase de latence (Harper et Lansbury, 1997). Ceci a été observé avec plusieurs protéines de l'AL. L'ajout de 5% de noyaux à une réaction de formation de fibres à partir de SMA a permis une réduction de la phase de latence de moitié



comparativement à une réaction sans nucléation (Davis et al., 2000). En ce qui concerne la protéine AL-103, la présence de 0.4% de noyaux accélère de façon significative la cinétique de fibrillation sous différentes conditions expérimentales (Martin et Ramirez-Alvarado, 2010; Martin et Ramirez-Alvarado, 2011).

#### **1.7.7 Stress oxydatif et modifications post-traductionnelles dans l'AL**

Les modifications post-traductionnelles (PTMs) pourraient être impliquées dans l'amyloïdogénicité des chaînes légères. Parmi les facteurs de risques amyloïdogéniques identifiés par Stevens dans les chaînes légères  $\kappa$ I, la N-glycosylation a été retrouvé dans 22 des 121 échantillons, et 18 de ces 22 échantillons étaient amyloïdogéniques (Stevens, 2000). D'autres études ont révélé que les protéines de l'AL étaient plus fréquemment glycosylées que les LCs libres non amyloïdogéniques (Holm et al., 1986; Omtvedt et al., 1997). Malgré ces éléments de réponse, le rôle précis de cette PTM reste à déterminer.

Une autre étude portant sur neuf LCs  $\kappa$ I a révélé plusieurs différentes PTMs sur des chaînes légères de pleine longueur. Chacune des protéines étudiées présentait au moins un type de PTM dont la N-glycosylation, la dimérisation par pont disulfure, la S-cystéinylation, la fragmentation, la S-sulfonation et la formation de 3-chlorotyrosine (Connors et al., 2007). L'impact exact de ces modifications sur la pathogenèse de l'AL est inconnu, mais il a été suggéré que la cystéinylation de certaines autres protéines pourrait induire des changements conformationnels pouvant mener à un mauvais repliement (Chen et al., 1999; Watarai et al., 2000), tandis que les résidus chlorotyrosine ont été associés au dommage oxydatif (Mohiuddin et al., 2006).

Il est possible que certaines PTMs retrouvées chez des protéines AL aient un rôle protecteur contre l'amyloïdogénèse. Les deux protéines les plus intensément modifiées dans l'étude mentionnée plus haut (Connors et al., 2007) possédaient une méthionine oxydée en méthionine sulfoxyde. La méthionine et la cystéine sont les



acides aminés les plus couramment oxydés et l'oxydation d'une méthionine pourrait protéger d'autres acides aminés d'importance critique contre le dommage causé par des ROS (Levine et al., 2000). L'étude d'une protéine du myélome multiple LEN a montré que la forme de la protéine dont la méthionine était oxydée menait à la formation d'agrégats amorphes et non de structures amyloïdes organisées (Hu et al., 2008). Il semblerait donc que l'oxydation de la méthionine pourrait offrir une certaine protection contre l'amyloïdogénicité. Toutefois, comme l'oxydation de la méthionine est un processus fluctuant, son effet antioxydant pourrait être surpassé par une prépondérance de facteurs amyloïdogéniques.

L'étude des effets de l'oxydation sur les protéines de l'AL est très pertinente puisqu'il a été démontré que le stress oxydatif est associé aux dépôts de fibres amyloïdes ainsi qu'au mécanisme de mort cellulaire (Ando et al., 1997; Merlini et Westermarck, 2004). Une étude a mis en évidence des dépôts amyloïdes de LCs renfermant du 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE), un produit de la peroxydation de lipides qui révèle un dommage oxydatif (Ando et al., 1997). Cependant, il n'a pas été possible de déterminer si le stress oxydatif était impliqué dans l'amyloïdogénèse ou si les fibres avaient déclenché le stress oxydatif après leur dépôt. Toutefois, une étude plus récente a suggéré qu'un stress oxydatif causé par des LCs amyloïdogéniques solubles joue un rôle dans la mort cellulaire. Il a été démontré que le traitement de cardiomyocytes avec ces protéines amyloïdogéniques entraîne une augmentation des niveaux de ROS intracellulaires (Brenner et al., 2004). De plus, la contractilité et la relaxation des cardiomyocytes étaient affectées, montrant un lien entre ces LCs solubles et la cardiomyopathie chez les patients qui souffrent d'AL.

## **1.8 Problématique, hypothèses et objectifs**

Historiquement, la communauté scientifique considérait que l'accumulation des fibres amyloïdes était la principale cause de la dégénérescence tissulaire associée aux amyloïdoses. Toutefois, des études récentes portant sur différentes protéines

amyloïdogéniques ont montré que les espèces oligomériques et/ou préfibrillaires induisent la mort cellulaire tandis que les fibres amyloïdes matures ne sont que faiblement cytotoxiques. Ces études ont révélé que le développement d'une approche thérapeutique pour ralentir la progression des maladies amyloïdes doit se baser sur une meilleure connaissance des étapes précoces du processus d'auto-assemblage et non sur une simple inhibition de la formation de la structure amyloïde. En outre, la caractérisation des intermédiaires toxiques de la cascade amyloïdogénique revêt une grande importance, mais reconnaître les espèces «on-pathway» et «off-pathway» de la voie qui mène à la formation des fibres est tout aussi pertinent. En effet, la stabilisation d'une conformation non toxique et/ou non amyloïdogénique est considérée comme une des approches les plus efficaces dans le traitement des maladies amyloïdes.

Les premières études portant sur les bases moléculaires de l'AL ont rapporté que les chaînes légères amyloïdogéniques présentaient une stabilité thermodynamique inférieure à leurs équivalents non amyloïdogéniques. Ces résultats ont initialement mené à la conclusion que la stabilité thermodynamique était le seul facteur responsable de l'amyloïdogénicité des chaînes légères. De ce fait, la majorité des études récentes ciblaient l'identification des mutations susceptibles d'influencer la stabilité des chaînes légères. Néanmoins, il a été suggéré que des caractéristiques structurales et physico-chimiques autres que la stabilité de la protéine pourraient contribuer à l'amyloïdogénicité. Par exemple, il a été rapporté que les LCs ont tendance à s'associer en dimères et il a été suggéré que cette homodimérisation pourrait moduler l'assemblage des fibres amyloïdes. Cependant, le rôle précis de cette conversion conformationnelle quaternaire dans la fibrillation n'a pas encore été élucidé. De même, certaines modifications post-traductionnelles oxydatives pourraient induire des changements structuraux et chimiques chez la protéine native, affectant ainsi son caractère amyloïdogénique. Toutefois, l'impact des modifications post-traductionnelles oxydatives sur la structure et l'amyloïdogénicité des LCs n'est

pas bien connu. Finalement, de nombreuses interrogations persistent toujours quant à la relation entre la cytotoxicité des protéines LC et leur conformation quaternaire.

Dans cette optique, l'hypothèse de ce projet de recherche est que les changements structuraux ainsi que les modifications physico-chimiques pourraient avoir un impact aussi important que les variations de stabilité sur la propension des LCs à s'assembler en fibres amyloïdes.

L'objectif principal de cette étude est donc d'évaluer l'impact des changements structuraux et des modifications physico-chimiques sur l'amyloïdogénicité et la toxicité des chaînes légères d'anticorps impliquées dans l'AL. Plus précisément, les objectifs spécifiques du projet sont les suivants :

1. Comprendre le rôle de la dimérisation des LCs sur leur amyloïdogénicité.
2. Évaluer la cardiotoxicité des espèces selon leur structure quaternaire.
3. Identifier les résidus susceptibles de subir des modifications post-traductionnelles oxydatives.
4. Analyser l'impact de ces modifications post-traductionnelles oxydatives sur l'amyloïdogénicité et leur(s) mécanisme(s) d'action.

## CHAPITRE II

### PROBING THE ROLE OF $\lambda$ 6 IMMUNOGLOBULIN LIGHT CHAIN DIMERIZATION IN AMYLOID FORMATION

Mathieu Laporte Wolwertz<sup>a,b</sup>, Phuong Trang Nguyen<sup>a,b</sup>, Noé Quittot<sup>a,b</sup> and Steve Bourgault<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>*Department of Chemistry, Pharmaqam, University of Québec in Montreal, Montreal, QC, Canada, H3C 3P8*

<sup>b</sup>*Quebec Network for Research on Protein Function, Structure, and Engineering, PROTEO*

**\*Corresponding author:**

Pr. Steve Bourgault,  
Université du Québec à Montréal  
C.P. 8888, Succursale Centre-Ville  
Montréal (Québec), H3C 3P8, Canada  
1-514-987-3000 (5161)  
[bourgault.steve@uqam.ca](mailto:bourgault.steve@uqam.ca)

L'article qui suit a été soumis pour publication au journal «Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics» le 21 août 2015. Le numéro de soumission est BBAPRO-15-351.



## 2.1 Résumé

L'amyloïdose à chaînes légères (AL) est une maladie létale caractérisée par l'accumulation de chaînes légères d'anticorps (LC) mal repliées sous forme de fibres amyloïdes et d'agrégats amorphes dans l'espace extracellulaire d'organes vitaux. À ce jour, ni les mécanismes exacts permettant l'auto-assemblage des LCs, ni la base moléculaire entraînant la défaillance des cellules et des organes ne sont encore bien compris. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la relation entre la structure quaternaire, la stabilité et l'amyloïdogénicité de domaines variables de LC ( $V_L$ ) de la lignée  $\lambda 6$ . Nous avons observé que la LC amyloïdogénique  $\lambda 6$  Wil ainsi que la LC non amyloïdogénique  $\lambda 6$  Jto s'associent en dimères de façon dépendante de la concentration et que l'affinité des dimères est diminuée considérablement à force ionique élevée. Nos résultats ont montré que la forme dimérique ralentit le changement conformationnel associé à la formation de fibres amyloïdes et que le monomère est essentiel pour initier l'amyloïdogénèse. Des études de dénaturation thermique et chimique ont révélé que les dimères de  $V_L$   $\lambda 6$  ont une stabilité équivalente à celle du monomère. Ceci indique que l'effet protecteur procuré par la dimérisation n'est pas dû à la stabilité thermodynamique, mais probablement à des caractéristiques structurales spécifiques. La toxicité des monomères de Jto et de Wil ainsi que celle d'agrégats fibrillaires ont été évaluées sur des cardiomyoblastes, et les espèces non amyloïdes ont réduit la viabilité cellulaire. Cette étude apporte de nouvelles informations sur le processus complexe de l'amyloïdogénèse des LC et suggère que la stabilisation du dimère représente une stratégie prometteuse pour prévenir l'auto-assemblage et les dépôts amyloïdes.

## 2.2 Abstract

Light chain amyloidosis (AL) is a lethal disease associated with the deposition of misfolded immunoglobulin light chains (LC) as amyloids and amorphous aggregates in the extracellular space of vital organs. The exact mechanisms of LC self-assembly and the molecular basis leading to cellular and organ failure still remain poorly understood. In this study, we investigated the relationship between the quaternary structure, the stability and the amyloidogenicity of LC variable domain ( $V_L$ ) from the  $\lambda 6$  germline. We observed that the amyloidogenic  $\lambda 6$  Wil and its non-amyloidogenic counterpart Jto dimerize in a concentration-dependent manner and that the dimer affinity is considerably decreased in presence of a high ionic strength. Our results showed that the dimeric state delays the structural conversion associated with amyloid formation and that the monomer is critical to initiate amyloidogenesis. Thermal and chemical unfolding studies revealed that the dimeric state of  $V_L \lambda 6$  has an equivalent stability to the monomer. This indicates that the protective effect of dimerization is not related to thermodynamic stability but, most likely, resides in specific structural features. The toxicity of monomeric Jto and Wil as well as fibrillar aggregates were evaluated on cardiomyoblasts and ThT-negative proteospecies reduced cellular viability. This study provides novel insights into the complex process of LC amyloidogenesis and suggests that dimer stabilization constitutes a promising strategy to prevent self-assembly and amyloid deposition.

## Keywords

Amyloid; Light chain amyloidosis; Immunoglobulin; Lambda germline; Dimerization; Aggregation

### 2.3 Introduction

Amyloidoses are a group of protein misfolding diseases which involve the deposition of protein aggregates in the extracellular space of organs and tissues [1]. These diseases result from the assembly of normally soluble proteins into amyloid fibrils [2]. Historically, it was assumed that amyloid deposition on its own was the underlying factor responsible for tissue degeneration and physiopathology progression. However, recent studies performed with amyloidogenic proteins, including transthyretin (TTR),  $\alpha$ -synuclein, the islet amyloid peptide and the peptide amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) have shown that oligomers and pre-fibrillar species induce cell death whereas mature amyloid fibrils are poorly cytotoxic [3-5]. These studies highlight the importance of investigating the early steps in protein aggregation. Identifying toxic intermediates of the amyloidogenic cascade is of great importance, but, understanding how on- and off-pathway proteospecies are linked together in the pathway leading to amyloid fibril formation is equally relevant. Particularly, stabilizing a non-toxic and/or a non-amyloidogenic conformation is considered to be one of the most efficient approaches for treating amyloid diseases, since it is still unclear which exact protein conformation(s) induces cell degeneration [6]. Such strategy has led to the discovery of the first regulatory-agency-approved drug used to treat TTR amyloidosis, Tafamidis® [7]. This small molecule acts by stabilizing the tetrameric form of TTR, preventing its dissociation into monomers and thus inhibiting amyloid formation [8].

Light chain amyloidosis (AL) is the most common systemic amyloidosis [9, 10]. AL is a hematological disorder in which a clonal B cell population expands and secretes an excess of free immunoglobulin light chains (LC) into circulation [10]. LC protein deposition in the extracellular space of vital organs is associated with organ failure and, eventually, to death [11, 12]. Patients afflicted with AL have amyloid fibrils predominantly constituted of the LC variable domain (V<sub>L</sub>), sometimes coupled with a short fragment of the constant domain [13]. As reported for other amyloid diseases,



soluble intermediate species could be responsible for the major cytotoxicity observed in AL. A study using two  $\kappa 1$  V<sub>L</sub> (AL-09, AL-12) associated with AL has shown that soluble species of these recombinant proteins induce cardiomyocyte death [14]. Moreover, it has been reported that amyloidogenic LC proteins cause oxidative stress and dysfunction of cardiomyocytes and heart preparations and this deleterious effect is independent of fibril deposition [15, 16]. Thus, therapeutic strategies targeting LC assembly and AL progression should aim at preventing the formation of prefibrillar oligomers and not at inhibiting the later stages of fibrillogenesis.

In this context, we investigated the molecular basis of V<sub>L</sub> protein self-assembly by investigating the complex relationship between the quaternary structure, the amyloidogenicity and the cytotoxicity. We focused on two LCs of the  $\lambda 6$  germline. Monoclonal LCs of the V<sub>L</sub>  $\lambda 6$  subgroup are intrinsically associated with AL, with one notable exception [17, 18]. The sequence of the first LC protein used in this study derives from a patient (Wil) who was afflicted with AL amyloidosis with renal amyloid deposits. The second V<sub>L</sub>  $\lambda 6$  sequence originates from a patient (Jto) who suffered from multiple myeloma and had no clinical manifestation of amyloidosis [19]. It has been reported that V<sub>L</sub>  $\lambda 6$  Wil is thermodynamically less stable than its non-amyloidogenic counterpart Jto and this correlates with the faster fibrillization kinetics of Wil. This data and other reports have originally led to the conclusion that the stability solely dictates fibril-forming propensity of LC proteins [10, 19-21]. However, structural and physicochemical parameters other than the inherent protein stability have been recently reported to contribute to the self-assembly propensity of  $\lambda 6$  LC. For instance, although Jto shares a high sequence homology with other amyloidogenic V<sub>L</sub>  $\lambda 6$ , it is unique due to the concomitant presence of residues Asp and Arg at positions 29 and 68, respectively. Structural comparison of Wil and Jto has shown significant homology, with the exception of the presence of a salt-bridge between residues D29 and R68 in Jto [22]. It has been observed that the substitution of residue R68 by a Ser hastens Jto fibrillogenesis and the enhanced amyloidogenic



potential of the R68S Jto mutant is ascribed to side-chain conformational changes, leading to a greater exposure of hydrophobic surface [17]. A recent study has shown that the N-terminal strand in  $\lambda 6$  LC modulates the aggregation behavior of the protein [23]. Besides, while it has been reported that dimer affinity and stability of LCs could also play a critical role in amyloidogenesis [24-27], the role of the quaternary structure in amyloid formation has not been addressed so far for  $\lambda 6$  V<sub>L</sub>.

In this study, we examined the contribution of the monomer-dimer equilibrium in LC  $\lambda 6$  amyloid formation. By combining biophysical approaches, we observed that both Jto and Wil display a similar propensity to dimerize in a concentration-dependent manner and that the monomeric state of V $\lambda 6$  LC was necessary for fibrillization. Interestingly, the dimeric form had similar stability to its monomeric counterpart, suggesting that other factors than the thermodynamic stability, such as tertiary structural features, could explain the protective effect of dimerization. Finally, the cardiotoxicity of  $\lambda 6$  V<sub>L</sub> proteins and LC fibrillar aggregates were investigated.

## 2.4 Materials and methods

### *Cloning, expression and purification of $V_{\lambda 6}$ LC proteins.*

Genes encoding the variable domain of Wil and Jto immunoglobulin light chain protein (Life technologies) were cloned into pet22b(+) plasmid (Novagen). The resulting clones were transformed into *E.coli* BL21 (DE3) competent cells. Proteins were expressed under the control of the T7 *lac* promoter with a *pel* B leader sequence directing export to the periplasm of the cell. Transformed BL21(DE3) cells were grown overnight at 37°C in LB culture media containing 50 µg/ml ampicillin sodium salt with agitation at 225 rpm. LB/ampicillin culture media was inoculated with the overnight starter culture and grown to an  $A_{600}$  between 0.6 and 0.8. Expression was induced with 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside. According to the protocol previously developed [19], to obtain Wil in a soluble form from the periplasm, the temperature and agitation conditions were set to 30°C and 125 rpm, respectively. After 4 h, cells were harvested and resuspended in 0.4 volume of 30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 20% sucrose, pH 8. The solution was stirred slowly at room temperature for 10 min. Cells were collected by centrifugation at 4°C for 10 min at 7,000 g and resuspended in 0.4 volume of ice-cold 5 mM MgSO<sub>4</sub>. Cell suspension was stirred slowly for 15 min on ice, and centrifuged as described above. The obtained periplasmic fraction was lyophilised before being resuspended in 10 mM phosphate buffer pH 7.4, with or without 150 mM NaCl. The protein was filtered through a 0.2 µm pore-sized filter then purified using size exclusion chromatography (SEC; HiLoad 16/600 Superdex 75 column) in 10 mM phosphate buffer pH 7.4, with or without 150 mM NaCl. The purity of each fraction was verified by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and LC-MS-TOF. Protein concentrations were determined by measuring the absorbance at 280 nm, using a theoretical molar extinction coefficient of 14440 M·cm<sup>-1</sup> for Jto and 12950 M·cm<sup>-1</sup> for Wil.

### *Analytical size exclusion chromatography*

One hundred microliters (100  $\mu$ L) of protein samples (0.05 to 2.0 mg/ml) to be analyzed were injected into a calibrated Superdex 75 10/300 GL gel filtration column. The running buffer was 10 mM phosphate pH 7.4, with or without 150 mM NaCl. Eluates were analyzed by UV detection at 280 nm.

### *Amyloid formation kinetics measured by Thioflavin T fluorescence*

Assays were performed at 37°C in sealed black-wall, clear-bottom 96-well polystyrene non treated microplates (Corning), with a total volume of 85  $\mu$ l per well and a final concentration of 40  $\mu$ M thioflavin T (ThT). Protein concentrations varied between 0.05 and 2.0 mg/ml in 10 mM phosphate buffer pH 7.4, with or without 150 mM NaCl. ThT fluorescence was measured every 10 minutes over the course of 10 h, with constant orbital stirring between reads, using a SpectraMax i3 (Molecular Devices) plate reader. The fluorescence, with excitation at 440 nm and emission at 485 nm, was measured from the bottom of the well. For each experiment, control reactions (without protein) were carried. Data obtained from triplicate wells were averaged, corrected by subtracting the corresponding control reaction, and plotted as fluorescence versus time. Each curve represents the average of at least two independent experiments (from two different lot of protein) performed in triplicate. Data of time-dependence of ThT fluorescence were fitted to a sigmoidal growth model where  $T_{50}$  is the time required to reach half of the fluorescence intensity,  $k$  is the apparent first-order constant and  $Y_{\max}$  and  $Y_0$  are, respectively, the maximum and initial fluorescence values:

$$Y = Y_0 + (Y_{\max} - Y_0)/(1 + \exp(-(T - T_{50})/k))$$

The lag time, *i.e.* the time before detectable amyloid formation occurs, as predicted by means of the nucleation dependent polymerization model, is described as  $T_{50} - 2/k$ .

### *Circular dichroism spectroscopy*

Circular dichroism (CD) measurements were performed using a Jasco J-815 spectropolarimeter. Far-UV spectra (250-200 nm) were collected in 1 to 5 mm path-length cells whereas near-UV spectra (320-250 nm) were collected in 2 to 10 mm path-length cells with protein concentrations ranging from 0.05 to 2.5 mg/mL. The wavelength step was set at 0.5 nm with a scanning speed of 20 nm/min. All assays were performed in 10 mM phosphate buffer pH 7.4 (with or without 150 mM NaCl). Blanks were subtracted and the raw data was converted to mean residue ellipticity (MRE):

$$\text{MRE} = \frac{\text{Mean residue weight (g. mol}^{-1}\text{)} \times \text{CD signal (deg)}}{10 \times \text{pathlength (cm)} \times \text{protein concentration (g. ml}^{-1}\text{)}}$$

Thermal denaturation experiments were performed by measuring the ellipticity at 218 nm over a temperature range of 4 to 80 °C. Temperature was increased by 1.0°C/min. Assuming a two-state folding mechanism, the fraction of the folded conformation ( $F_f$ ) was obtained using the following formula:

$$F_f = (y - y_u) / (y_f - y_u)$$

where  $y_f$  and  $y_u$  represent the ellipticity signal at 218 nm characteristic of the folded and unfolded conformations, respectively, whereas  $y$  correspond to the value measured at the indicated temperature. The values of  $y_f$  and  $y_u$  were obtained by linear regression of the data before and after the unfolding transition, respectively. A sigmoidal curve fit was subsequently used to obtain the  $T_m$ , *i.e.* the midpoint of the denaturation transition, as previously described [26].



### *Tryptophan fluorescence*

Tryptophan fluorescence was measured using a LS 45 Fluorescence Spectrometer (Perkin Elmer, Waltham, MA). Fluorescence spectra from 320 to 400 nm were collected with an excitation wavelength of 295 nm. The protein concentration during measurements varied between 0.05 to 2.0 mg/ml in 10 mM phosphate buffer pH 7.4, with or without 150 mM NaCl. For chemical denaturation experiments, LC protein samples were incubated in 10 mM phosphate buffer pH 7.4 ( $\pm$  150 mM NaCl) containing varying amounts of GdnHCl (0-3 M) for 16 h at 25°C before measurement. Data of fluorescence intensity at 350 nm were analyzed as described previously for the thermal denaturation. The  $C_m$  is the concentration of denaturant where 50% of the protein is unfolded.

### *Dynamic light scattering*

Dynamic light scattering (DLS) measurements were performed at 20°C using a Malvern Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments, UK) containing a 4 mW helium-neon laser with a wavelength of 633 nm and a scattering angle of 90°. To ensure accurate readings, the final distribution was taken from an accumulation of 100 individual, 60s DLS collections. Light chain concentrations varied between 0.05 to 2.0 mg/ml in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, with or without 150 mM NaCl. The experimental results were analyzed using the built-in Zetasizer software 7.11 and the results were plotted as number of distribution (%) of particles versus hydrodynamic radius (nm).

### *Cell toxicity assay*

Rat H9c2 cardiomyoblasts were maintained in high glucose (4.5 g/L) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 4 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 1 mM sodium pyruvate.

Cells were maintained as a monolayer at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air and passaged by trypsinization when the cells reached 70-80% confluence. For cytotoxicity assay, H9c2 cells were seeded in black wall clear bottom 96-well plates (TC treated) at a density of 15,000 cells/well (100 µl/well). After 24 h incubation at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator, cells were treated with 50 µl of LC protein solutions at 3× of final concentration in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl. Cells were then incubated between 24 to 72 h and cell viability was measured by the resazurin reduction assay. Cell viability (in %) was calculated from the ratio of the fluorescence of the treated sample to the control cells (vehicle treated).

## 2.5 Results and discussion

### *Monomer-dimer equilibrium of $\lambda 6 V_L$ Wil and Jto: effect of ionic strength*

While it has been observed that isolated LC variable domains have a propensity to dimerize in a concentration-dependent manner [24, 25, 27-29], the role of  $\lambda 6$  LC dimerization in amyloid formation has never been addressed. As it is known that higher ionic strength decreases dimer affinity [24], we initially examined the monomer-dimer equilibrium of  $\lambda 6 V_L$  in absence or in presence of 150 mM NaCl in 10 mM phosphate buffer pH 7.4. By analytical SEC using a calibrated Superdex 75 column, we observed that Wil, injected at 1.0 mg/mL in presence of 150 mM NaCl, was mainly monomeric with an elution volume of 13.9 mL corresponding to an apparent molecular mass of around 12 kDa (Figure 2.1A). In low ionic strength buffer, Wil injected at 1.0 mg/mL was instead eluted at 12.5 mL, corresponding to the dimeric form of the protein ( $\cong 24$  kDa). The dimerization of Wil was also measured by DLS. In presence of 150 mM NaCl, the reported average hydrodynamic radius of Wil was  $1.4 \text{ nm} \pm 0.2$  (Figure 2.1B), a value within the range of what is expected for a monomeric 12 kDa protein [30]. In contrast, in low ionic strength buffer, an average hydrodynamic radius of  $3.1 \pm 0.4$  was observed. The non-amyloidogenic  $\lambda 6 V_L$  Jto also demonstrated an ionic strength-dependent dimerization (Supplemental Figure S2.1). Thus, both  $\lambda 6 V_L$  proteins are monomeric in 150 mM NaCl whereas in absence of salt the proteins are predominantly dimeric at 1.0 mg/mL.

We then used near-UV CD spectroscopy to accurately probe the association state of  $\lambda 6 V_L$  proteins as a function of protein concentration in low and high ionic strength buffer. It has been previously shown that monomer/equilibrium can be accurately measured by near-UV CD spectroscopy [25, 26]. Moreover,  $\lambda 6 V_L$  exhibits several aromatic residues at the dimer interface (Figure 2.1C), facilitating the study of dimerization by near-UV CD spectroscopy. As anticipated from SEC and DLS analysis, near-UV CD spectra were not affected over Wil concentrations ranging

from 0.05 to 2.0 mg/mL in presence of 150 mM NaCl (Figure 2.1D). This data suggests that the microenvironment of aromatic residues, perhaps the tertiary and/or quaternary structures, were not modified. In sharp contrast, in low ionic strength buffer, a significant shift of the MRE between 265 and 290 nm was observed at concentrations over 0.5 mg/mL and over (Figure 2.1E). This indicates that the microenvironments of Tyr and Phe residues, probably Y35, Y86, Y90 and F97 located at the dimer interface (Figure 2.1C), are altered when Wil concentration is increased, most likely resulting from homodimerization. From the dependence of ellipticity at 270 nm on Wil concentration in absence of NaCl, a dissociation constant of  $56 \pm 9 \mu\text{M}$  (0.71 mg/mL) was determined (Figure 2.1F). This value is within the range of what has been previously reported for other isolated  $V_L$ , with dimer dissociation constants ranging from 3 to 217  $\mu\text{M}$  [23, 27, 29]. The presence of 150 mM NaCl decreased the dimer affinity considerably, with Wil remaining mainly monomeric at concentrations over 2 mg/mL (160  $\mu\text{M}$ ). Similarly, Jto populated monomeric species at concentrations ranging from 0.05 to 2.0 mg/mL in presence of NaCl, whereas in low ionic buffer a dissociation constant of  $49 \pm 3 \mu\text{M}$  (0.62 mg/mL) was determined (Supplemental Figure S2.1). This result highlights that  $\lambda 6 V_L$  dimer interface is considerably affected by the presence of 150 mM NaCl, indicating key contributions of electrostatic interactions in dimer stability. In contrast, the dimer affinity of the  $\kappa 1 V_L$  proteins AL-09 and O18/O8 were slightly affected by the presence of 100 mM NaCl [24], suggestive of dissimilarities among LC  $V_L$  in residues participating in dimer stability.



*Effect of  $\lambda 6$   $V_L$  dimerization on amyloid formation*

To probe the role of the monomer-dimer equilibrium in  $\lambda 6$   $V_L$  self-assembly, we examined the kinetics of fibril formation of Wil and Jto as a function of protein concentration in low (10 mM phosphate, pH 7.4) and high ionic strength solutions (10 mM phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4). Amyloid formation was assessed using the fluorescent dye ThT, which exhibits a strong increase of its fluorescence quantum yield upon its specific binding to cross- $\beta$ -sheet quaternary structure, characteristic of amyloid fibrils [31]. To favor self-assembly at physiological pH and temperature, protein solutions were subjected to constant agitation at 37°C. Amyloid formation is often ascribed as a nucleation-dependant polymerization process that is characterised by the rate-limiting formation of the nucleus, resulting from the equilibrium between monomers that are and are not assembly competent, *i.e.* the ThT-negative lag phase [32]. Once the nucleus is formed, assembly occurs rapidly by the addition of competent monomers to the growing ends of the fibrils, *i.e.* the ThT positive elongation phase. In absence of NaCl where Wil dimer affinity was increased, the length of the lag phase decreased with increasing Wil concentration at low concentration (< 0.2 mg/mL). In contrast, the observed lag phase became significantly longer as the protein concentration was increased from 0.4 to 0.8 mg/ml (Figure 2.3A, Figure 2.3C). At a concentration of 1.0 mg/mL, no increase of ThT fluorescence could even be observed after 10 h incubation. This is opposite to what is usually predicted for a nucleation-dependent polymerization where self-assembly should have a linear dependence to protein concentration, suggesting the existence of off-pathway species whose formation is concentration driven. Interestingly, whereas the lag phase was inversely dependent on protein concentration, the maximum ThT fluorescence intensities reached after 600 min incubation were concentration-dependent (Figure 2.3A, Figure 2.3C). This indicates that the off-pathway state delays the nucleation process, but once the competent nucleus is assembled, the total amount of ThT-positive species formed is not affected.

In sharp contrast, in presence of 150 mM NaCl, the kinetics of Wil fibril formation was dependant on protein concentration, with both the lag phase decreasing and the final ThT intensity increasing proportionally to protein concentration (Figure 2.3B, Figure 2.3C). For example, for Wil protein concentrations of 0.05 and 1.0 mg/ml the lag phase lasted  $298 \pm 17$  and  $156 \pm 24$  min, respectively. As observed by SEC, DLS and CD spectroscopy, Wil had a significant propensity to dimerize in low ionic strength buffer with a dissociation constant of 0.7 mg/mL, whereas in presence of 150 mM NaCl, it remained predominantly monomeric. On the one hand, in low ionic strength buffer, Wil dimerized in a concentration-dependent manner, leading to a decrease rate of fibril formation at protein concentrations over 0.4 mg/mL. On the other hand, the presence of 150 mM NaCl shifted the dimer-monomer equilibrium toward the monomer, leading to shorter lag-phase at high protein concentrations. These findings correlate with previous studies performed with AL-09, LEN and SMA V<sub>L</sub> and advocate that the monomer is critical for fibrillization whereas dimerization delays amyloid formation [25-27]. Besides, the non-amyloidogenic Jto did not lead to any increase of ThT fluorescence after 600 min incubation under constant agitation for all concentrations evaluated (0.05 to 1 mg/mL) in absence or in presence of 150 mM NaCl (Supplemental Figure S2.2).

*Dimerization delays secondary and tertiary structural transition associated with amyloid formation*

To gain some initial insights regarding the mechanism(s) by which dimerization delays Wil amyloid formation, the structural changes occurring during  $\lambda 6$  V<sub>L</sub> fibrillization were probed by a combination of biophysical approaches, including CD spectroscopy, tryptophan fluorescence, DLS and AFM. Analyses were performed over incubation time at two Wil concentrations (0.05 and 2.0 mg/mL) under the conditions of the ThT assays (Figure 2.2), *i.e.* constant agitation at 37°C, 10 mM phosphate, pH 7.4,  $\pm$  150 mM NaCl. At low ionic strength, Wil was mainly

monomeric at 0.05 mg/mL (4  $\mu$ M) whereas it was predominantly dimeric at 2.0 mg/mL (160  $\mu$ M). Far-UV CD spectra of native Wil (before self-assembly) was characterized by two minima at 218 and 233 nm and the dimeric and monomeric states showed equivalent spectra, suggestive of identical secondary structure (Figure 2.3A). These somewhat unusual far-UV CD spectra are typical for LC V<sub>L</sub> proteins, such as LEN [26] and AL-09 [24]. The minimum at 218 nm is related to the presence of  $\beta$ -sheet secondary structures in native Wil (Figure 2.1C) whereas the minimum at around 233 nm is attributed to the presence of aromatic clusters [26, 33]. After 600 min incubation under constant agitation at 0.05 mg/mL, an increase in negative ellipticity at 225 nm was observed while both minima at 218 and 230 nm disappeared and a high-intensity maximum appeared at 200 nm (Figure 2.3A). This spectrum is consistent with an associated  $\beta$ -sheet structure characteristic of amyloid fibrils [34]. Wil self-assembly induced a significant increase in the near-UV CD-signal intensity between 250 and 270 nm and an even more dramatic increase between 270 and 295 nm (Figure 2.3B). As Wil LC encompasses 4 Phe, 5 Tyr and 1 Trp (Figure 2.1C), these changes revealed that the environment of some or all of these residues was reorganized during the process of amyloid formation. In sharp contrast, when Wil was subjected to constant agitation at 2.0 mg/mL for 600 min, no changes of its secondary and tertiary structure was observed, consistent with the ThT-negative signal.

Wil includes only one Trp residue located at position 35, partially buried inside the protein (Figure 2.1C), which facilitates the spectroscopic assessment of its conformational transition. Monomeric LC self-assembly (0.05 mg/mL) into ThT positive-aggregates induced a slight decrease of the 355/335-nm emission intensity ratio ( $F_{355}/F_{335}$ ), from 0.88 to 0.79. This blue shift suggests that the tryptophan is slightly more buried upon fibrillation of Wil. Particularly, an intense increase of Trp fluorescence emission was observed (Figure 2.3C). Since Trp fluorescence intensity is sensitive to conformational modifications, this indicated a major reorganization of



the residue side chain microenvironment. In sharp contrast, when incubated at 2.0 mg/mL under constant agitation for 600 min, no change in Trp fluorescence spectra was observed, suggesting that dimerization prevents the conformational reorganization of Trp35 environment. Interestingly, Wil intrinsic fluorescence emission spectrum was affected by its dimerization as the  $F_{355}/F_{335}$  ratio was 0.96 at 2.0 mg/mL compared to 0.88 at 0.05 mg/mL, indicating an increase of polarity within Trp-35 environment upon association. Particularly, the fluorescence intensity, relative to total protein concentration, was significantly decreased at high concentration, suggestive of Trp fluorescence self-quenching occurring within the dimer. Besides, it is known that the presence of nearby protonated residues can lead to Trp quenching. Thus, as observed by near-UV spectroscopy (Figure 2.1E), the microenvironment of Trp-35 was affected, *i.e.* the tertiary/quaternary structure, by Wil association while the secondary structure of the protein was preserved (Figure 2.3A).

AFM analysis of the amyloids assembled under these conditions revealed the formation of massive and heterogeneous aggregates that were very challenging to image and no distinctive fibrils could be easily observed. In fact, Wil self-assembly under constant agitation at physiological pH could also be monitored by turbidity measurement at 400 nm and correlated closely with the kinetics of amyloid formation measured by ThT fluorescence (Supplemental Figure S2.3). Unlike some amyloidogenic peptides, self-association of Wil under these conditions led to the formation of cross- $\beta$ -sheet-rich aggregates that did not exhibit long range order and, thus, well-defined fibrils were not easily formed. Although the fibrillar nature of the aggregates formed under constant agitation at physiological pH could not be easily confirmed by AFM, the formation of cross- $\beta$ -sheet quaternary structure could be assessed by far-UV CD spectroscopy and ThT fluorescence. Besides, incubation of Ito for 600 min under constant agitation at 37°C did not modify its secondary and tertiary structures, consistent with the ThT aggregation assay. It has been reported for V<sub>L</sub> LEN, when the protein is placed under constant agitation at pH 2 and at



concentrations over 0.1 mg/ml, that most structural changes, as measured by 1-anilino-8-naphthalenesulfonate (ANS) and Trp fluorescence as well as CD spectroscopy, occur before any increase of ThT signal [26]. In the present study, the conformation rearrangements monitored by Trp fluorescence and CD spectroscopy as well as the formation of aggregates detected by DLS occurred rather concurrently with the formation of fibrillary ThT-positive structure. This observation, in contrast to what has been observed for LEN at pH 2, suggests that the formation of the nucleus under constant agitation at pH 7.4 occurred (quasi)concomitantly with structural rearrangements and/or that upon protein conformational conversion into amyloid-competent conformation, the formation of the amyloid nucleus occurred very rapidly.

#### *Effect of $\lambda 6$ $V_L$ dimerization on protein stability*

Biophysical characterization revealed that Wil underwent major conformational rearrangements under constant agitation and that dimerization prevented these changes associated with amyloid assembly (Figure 2.3). The accelerating effect of agitation on fibrillization is commonly attributed to partial protein denaturation at the air-water interface. In turn, this interface phenomenon increased the population of partially folded (or misfolded) intermediates, favoring self-assembly. Thus, the inability of Wil dimer to form fibrils could be related to the thermodynamic stability of the dimer. It has been shown that the  $V_L$  protein SMA has an increased stability upon dimerization and that the dimer is protective against self-assembly [25]. In contrast, the  $\kappa 1$  AL-09 and O18/08 did not show any increase of stability upon dimerization [24]. Thus, the stabilities of  $V_L$   $\lambda 6$  monomer (4  $\mu$ M) and dimer (160  $\mu$ M) were investigated by GdnHCl titration monitored by Trp fluorescence and by thermal denaturation followed by the ellipticity at 218 nm. As revealed by CD spectroscopy, Jto and Wil at a 0.05 mg/mL concentration in low ionic strength buffer (monomeric) showed a thermal unfolding midpoint ( $T_m$ ) of  $49.1 \pm 1.0$  °C and  $41.8 \pm$

0.8 °C, respectively (Figure 2.4A). These values are somewhat higher to the  $T_m$  values previously obtained by Trp fluorescence, of 45.2°C and 38.3°C for Jto and Wil, respectively [19]. This difference can be ascribed to the higher sensitivity of Trp fluorescence to slight structural changes compared to the CD signal corresponding to  $\beta$ -sheet structures at 218 nm. Interestingly, increasing protein concentration to 2.0 mg/mL did not affect  $V_L \lambda 6$  thermal stability in low ionic strength buffer (Figure 2.4B). Considering that the dimer-monomer equilibrium is concentration-dependent in absence of NaCl, this data indicates that the association state does not modulate the thermodynamic stability of Wil and Jto. Similarly, the presence of 150 mM NaCl did not modify the thermal stability of Jto and Wil (Figure 2.4C).

Next, the stability of Wil in low ionic strength buffer as a function of its quaternary state was evaluated by chemical unfolding induced by GdnHCl. At a protein concentration of 0.05 mg/mL in absence of NaCl, where Wil is principally monomeric, the unfolding transition monitored by Trp fluorescence showed a  $C_m$  of  $0.84 \pm 0.09$  M GdnHCl (Figure 2.4D). This value was very close to 0.83 M previously reported for Wil at 20  $\mu$ g/mL in 10 mM phosphate, pH 7.5 [35]. When Wil concentration was increased to 2.0 mg/mL, at which the protein is dimeric, a  $C_m$  of  $0.87 \pm 0.06$  M GdnHCl was measured, indicating that dimerization did not increase the stability of the protein significantly. In fact, for Jto and Wil, the chemical unfolding experiments revealed that  $V_L \lambda 6$  proteins had similar stabilities in absence or in presence of NaCl and at different concentrations. These results are very intriguing and indicate that the dimeric quaternary state of  $V_L \lambda 6$  has similar stability to their respective monomer. Thus, the protective effect of dimerization on amyloid formation is not related to a greater thermodynamics stability of the dimer.

*Cytotoxicity of monomeric  $\lambda 6$  V<sub>L</sub> and fibrillar aggregates on cardiomyocytes*

Recent studies performed with amyloidogenic proteins have shown that oligomeric and/or pre-fibrillar assemblies are the most cytotoxic species of the amyloid cascade whereas mature amyloid fibrils exhibit low toxicity. Besides, it has been recently reported that the  $\kappa 1$  V<sub>L</sub> O18/O8, AL-09 and AL-12 decreased the cellular viability of HL-1 cardiomyocytes in a concentration-dependant manner with concentrations ranging from 10 to 20  $\mu$ M [14]. The toxicity of  $\lambda 6$  V<sub>L</sub> has not been investigated so far. Thus, we evaluated the cytotoxicity of LC Wil and its non-amyloidogenic counterpart Jto using H9c2 cardiomyoblasts. Both freshly purified Jto and Wil, in 150 mM NaCl (monomeric), reduced the cellular viability of H9c2 cells in a concentration and time-dependent manner (Figure 2.5). For instance, after 72 h treatment with 0.4 mg/mL (32  $\mu$ M) of Wil, a cellular viability of  $48.3 \pm 4.3$  % was measured whereas the same treatment with the non-amyloidogenic Jto led to a  $46.7 \pm 5.2$  % viability. Thus, there is not a clear relation between the *in vitro* amyloidogenicity and the cardiotoxicity of  $\lambda 6$  V<sub>L</sub>. These cytotoxic values are very close to the results previously obtained for  $\kappa 1$  V<sub>L</sub> with HL-1 cardiomyocytes [14]. We then probed the cardiotoxicity of Wil protein as a function of the assembly state, *i.e.*, monomers vs ThT-positive aggregates. Amyloid fibrils were prepared by incubating Wil at a concentration of 1.2 mg/mL under constant agitation at 37°C for 20 hours in sterile conditions and the fibrillar nature of the aggregates was assessed by ThT-fluorescence and CD spectroscopy. Amyloid assemblies were directly added to the culture media of H9c2 cardiomyoblast cells at a final concentration ranging from 0.05 to 0.4 mg/mL. Our results showed that treatments with Wil fibrillary aggregates for 24 to 72 hours, did not affect cardiomyoblast viability (Supplemental Figure S2.4). In summary, these assays indicate that native soluble  $\lambda 6$  proteins reduce cellular viability, although their deleterious effects are minor compared to other amyloidogenic polypeptides [3, 36], whereas ThT-positive aggregates are non-toxic.



## 2.6 Conclusions

Among amyloidoses, AL is unique for the high diversity of the primary structure of the amyloidogenic precursor. As a matter of fact, genes encoding immunoglobulin LC undergo somatic mutations allowing the expression of a protein with an infinite number of possible sequences. Although most of the pathogenic LCs of patients are derived from a few germline subtypes, including the  $\kappa$ I,  $\kappa$ IV,  $\lambda$ 2 and  $\lambda$ 6 [18, 37], this high heterogeneity of the amyloidogenic protein makes it very challenging to determine an unifying causative factor that dictates the amyloidogenicity of the LC protein. *In vitro* biophysical studies have initially advocated that the thermodynamic stability of the monomeric LC determines amyloid fibril formation propensity of the immunoglobulins [18, 19, 21]. However, it has been recently suggested that the amyloidogenicity of LC cannot be solely ascribed to thermodynamic instability, but also resides in specific tertiary structural features [17, 38]. Moreover, it has been reported for SMA, a LC belonging to the  $\kappa$ IV family, that the dimer is more stable than its monomeric counterpart and that dimerization inhibits amyloid formation [25] whereas the amyloidogenic  $\kappa$ I AL-09 dimer displays a similar thermodynamic stability to its monomeric counterpart [24]. These studies highlight the heterogeneity in the molecular basis determining the amyloid forming propensity of  $V_L$  and reinforce the necessity of additional studies examining the causative factors of LC amyloidogenesis.

In this study, we investigated the relationship between the conformational stability, the quaternary state and the amyloidogenicity of  $V_L$   $\lambda$ 6. In low ionic strength buffer, the lag phase of amyloid formation at physiological pH and temperature increased as the protein concentration increases, suggesting the existence of off-pathway species, the assembly of which is concentration driven. By analytical-SEC, DLS and near-UV CD spectroscopy, we observed that in low ionic strength buffer,  $V_L$  mostly populates dimeric species at concentrations over 0.5 mg/ml. In contrast, in presence of 150 mM



NaCl, Wil dimer affinity decreases significantly and the protein remains mainly monomeric at concentrations up to 2 mg/ml. This reduced dimer affinity in high ionic strength solution results in a linear dependence of the rate of fibril formation to protein concentration. These data indicate, as previously reported for the  $\kappa$ IV LC proteins SMA and LEN [25-27], that dimerization inhibits the formation of ThT-positive aggregates. Interestingly, the presence of NaCl decreased the dimer affinity in a similar way for the non-amyloidogenic  $\lambda$ 6 Jto. As observed by near-UV CD spectroscopy and analytical SEC, Wil and Jto display similar affinity of dimerization in low ionic strength buffer whereas both proteins remained mostly monomeric in presence of 150 mM NaCl. Thus the higher amyloidogenicity of Wil compared to Jto could not be ascribed to a difference in their dimer affinity.

Initiation of amyloid assembly from a natively folded protein, such as  $V_L$ , is commonly perceived to be driven by partial unfolding, or misfolding. Thus, we initially postulated that the inhibition of fibrillization upon dimerization arises from a higher stability of the dimeric protein, as reported for LC SMA [25] and the homotetrameric protein TTR [39]. Surprisingly, dimerization did not affect the thermal and the chemical unfolding of Wil, indicating that the protective effect of the dimer against amyloidogenesis is not related to an increase in its thermodynamic stability. It has been shown that the  $V_L$   $\lambda$ 6 mutants JtoD29A and JtoR68S have equivalent stability, although fibrillogenesis was faster for JtoR68S [17]. Whereas no significant polypeptidic backbone conformational changes were observed between these two mutants, the enhanced amyloidogenicity of JtoR68S was related to greater solvent exposure of hydrophobic surfaces and to modifications in the electrostatic potential surface [17]. It is known that mutations and/or structural changes that increase surface hydrophobicity and/or increase the net negative charge of a given protein enhance its amyloidogenicity [40]. Accordingly, the protective role of  $\lambda$ 6  $V_L$  dimerization could be related to discrete modifications within the tertiary structural features, as observed by near-UV CD spectroscopy and Trp fluorescence. As several

hydrophobic residues are located at the Wil putative dimer interface [22], dimerization can dramatically modify the solvent exposure of hydrophobic domains and, in turn, modulates its amyloidogenicity.

Overall, this study reinforces the notion that in addition to the thermodynamics stability of the V<sub>L</sub> domain, specific tertiary and/or quaternary structural perturbations can also modulate the amyloid formation propensity of LC proteins. Our results indicate that LC  $\lambda 6$  dimerization prevents the conformational rearrangements associated with amyloid self-assembly and delays fibrillization. Thus, rational drug design aimed at shifting the monomer-dimer equilibrium towards association may prevent LC self-assembly into amyloid fibrils and delay the progression of AL.

**Acknowledgements**

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (418614). M.L.W. is a recipient of a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada - Graham Bell scholarship.

**Author contribution**

M.L.W., P.T.N. and N.Q. performed the experimental work. M.L.W. designed the experiments, analyzed data and wrote the initial version of the paper. S.B. supervised the research and revised the paper.



## 2.7 References

- [1] F. Chiti, C.M. Dobson, Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu. Rev. Biophys.*, 75 (2006) 333-366.
- [2] F.E. Cohen, J.W. Kelly, Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases, *Nature*, 426 (2003) 905-909.
- [3] S. Bourgault, S. Choi, J.N. Buxbaum, J.W. Kelly, J.L. Price, N. Reixach, Mechanisms of transthyretin cardiomyocyte toxicity inhibition by resveratrol analogs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 410 (2011) 707-713.
- [4] C.A. De Carufel, P.T. Nguyen, S. Sahnouni, S. Bourgault, New insights into the roles of sulfated glycosaminoglycans in islet amyloid polypeptide amyloidogenesis and cytotoxicity, *Biopolymers*, 100 (2013) 645-655.
- [5] R. Kaye, E. Head, J.L. Thompson, T.M. McIntire, S.C. Milton, C.W. Cotman, C.G. Glabe, Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis, *Science*, 300 (2003) 486-489.
- [6] C. Soto, Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases, *Nature reviews. Neuroscience*, 4 (2003) 49-60.
- [7] S.M. Johnson, S. Connelly, C. Fearn, E.T. Powers, J.W. Kelly, The transthyretin amyloidoses: from delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug, *J Mol Biol*, 421 (2012) 185-203.
- [8] C.E. Bulawa, S. Connelly, M. Devit, L. Wang, C. Weigel, J.A. Fleming, J. Packman, E.T. Powers, R.L. Wiseman, T.R. Foss, I.A. Wilson, J.W. Kelly, R. Labaudiniere, Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109 (2012) 9629-9634.
- [9] C. Ionescu-Zanetti, R. Khurana, J.R. Gillespie, J.S. Petrick, L.C. Trabachino, L.J. Minert, S.A. Carter, A.L. Fink, Monitoring the assembly of Ig light-chain amyloid fibrils by atomic force microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96 (1999) 13175-13179.
- [10] M. Ramirez-Alvarado, Amyloid formation in light chain amyloidosis, *Curr Top Med Chem*, 12 (2012) 2523-2533.
- [11] A. Solomon, Light chains of human immunoglobulins, *Methods Enzymol*, 116 (1985) 101-121.
- [12] A. Solomon, Clinical implications of monoclonal light chains, *Semin Oncol*, 13 (1986) 341-349.
- [13] K.E. Olsen, K. Sletten, P. Westermark, Extended analysis of AL-amyloid protein from abdominal wall subcutaneous fat biopsy: kappa IV immunoglobulin light chain, *Biochem Biophys Res Commun*, 245 (1998) 713-716.
- [14] L.A. Sikkink, M. Ramirez-Alvarado, Cytotoxicity of amyloidogenic immunoglobulin light chains in cell culture, *Cell Death Dis*, 1 (2010) e98.
- [15] R. Liao, M. Jain, P. Teller, L.H. Connors, S. Ngoy, M. Skinner, R.H. Falk, C.S. Apstein, Infusion of light chains from patients with cardiac amyloidosis causes diastolic dysfunction in isolated mouse hearts, *Circulation*, 104 (2001) 1594-1597.



- [16] D.A. Brenner, M. Jain, D.R. Pimentel, B. Wang, L.H. Connors, M. Skinner, C.S. Apstein, R. Liao, Human amyloidogenic light chains directly impair cardiomyocyte function through an increase in cellular oxidant stress, *Circ Res*, 94 (2004) 1008-1010.
- [17] J.S. Wall, V. Gupta, M. Wilkerson, M. Schell, R. Loris, P. Adams, A. Solomon, F. Stevens, C. Dealwis, Structural basis of light chain amyloidogenicity: comparison of the thermodynamic properties, fibrillogenic potential and tertiary structural features of four VLambda6 proteins, *J Mol Recognit*, 17 (2004) 323-331.
- [18] E.M. Baden, L.A. Sikkink, M. Ramirez-Alvarado, Light chain amyloidosis - current findings and future prospects, *Current protein & peptide science*, 10 (2009) 500-508.
- [19] J. Wall, M. Schell, C. Murphy, R. Hrnčić, F.J. Stevens, A. Solomon, Thermodynamic instability of human lambda 6 light chains: correlation with fibrillogenicity, *Biochemistry*, 38 (1999) 14101-14108.
- [20] P.W. Stevens, R. Raffin, D.K. Hanson, Y.L. Deng, M. Berrios-Hammond, F.A. Westholm, C. Murphy, M. Eulitz, R. Wetzel, A. Solomon, et al., Recombinant immunoglobulin variable domains generated from synthetic genes provide a system for in vitro characterization of light-chain amyloid proteins, *Protein science : a publication of the Protein Society*, 4 (1995) 421-432.
- [21] M.R. Hurle, L.R. Helms, L. Li, W. Chan, R. Wetzel, A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (1994) 5446-5450.
- [22] P.R. Pokkuluri, A. Solomon, D.T. Weiss, F.J. Stevens, M. Schiffer, Tertiary structure of human lambda 6 light chains, *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 6 (1999) 165-171.
- [23] L. del Pozo-Yauner, J.S. Wall, M. Gonzalez Andrade, R. Sanchez-Lopez, S.L. Rodriguez-Ambriz, J.I. Perez Carreon, A. Ochoa-Leyva, D.A. Fernandez-Velasco, The N-terminal strand modulates immunoglobulin light chain fibrillogenesis, *Biochemical and biophysical research communications*, 443 (2014) 495-499.
- [24] E.M. Baden, B.A. Owen, F.C. Peterson, B.F. Volkman, M. Ramirez-Alvarado, J.R. Thompson, Altered dimer interface decreases stability in an amyloidogenic protein, *J. Biol. Chem.*, 283 (2008) 15853-15860.
- [25] Z. Qin, D. Hu, M. Zhu, A.L. Fink, Structural characterization of the partially folded intermediates of an immunoglobulin light chain leading to amyloid fibrillation and amorphous aggregation, *Biochemistry*, 46 (2007) 3521-3531.
- [26] P.O. Souillac, V.N. Uversky, I.S. Millett, R. Khurana, S. Doniach, A.L. Fink, Elucidation of the molecular mechanism during the early events in immunoglobulin light chain amyloid fibrillation. Evidence for an off-pathway oligomer at acidic pH, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 12666-12679.
- [27] P.O. Souillac, V.N. Uversky, I.S. Millett, R. Khurana, S. Doniach, A.L. Fink, Effect of association state and conformational stability on the kinetics of

immunoglobulin light chain amyloid fibril formation at physiological pH, *The Journal of biological chemistry*, 277 (2002) 12657-12665.

[28] H. Kolmar, C. Frisch, G. Kleemann, K. Gotze, F.J. Stevens, H.J. Fritz, Dimerization of Bence Jones proteins: linking the rate of transcription from an *Escherichia coli* promoter to the association constant of REIV, *Biol Chem Hoppe Seyler*, 375 (1994) 61-70.

[29] F.J. Stevens, F.A. Westholm, A. Solomon, M. Schiffer, Self-association of human immunoglobulin kappa I light chains: role of the third hypervariable region, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77 (1980) 1144-1148.

[30] H.P. Erickson, Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy, *Biol Proced Online*, 11 (2009) 32-51.

[31] H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa, T. Takeda, Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1, *Analytical biochemistry*, 177 (1989) 244-249.

[32] J.W. Kelly, Mechanisms of amyloidogenesis, *Nature structural biology*, 7 (2000) 824-826.

[33] N. Sreerama, M.C. Manning, M.E. Powers, J.X. Zhang, D.P. Goldenberg, R.W. Woody, Tyrosine, phenylalanine, and disulfide contributions to the circular dichroism of proteins: circular dichroism spectra of wild-type and mutant bovine pancreatic trypsin inhibitor, *Biochemistry*, 38 (1999) 10814-10822.

[34] H.A. Lashuel, S.R. Labrenz, L. Woo, L.C. Serpell, J.W. Kelly, Protofilaments, filaments, ribbons, and fibrils from peptidomimetic self-assembly: implications for amyloid fibril formation and materials science, *Journal of the American Chemical Society*, 122 (2000) 5262-5277.

[35] L. del Pozo Yauner, E. Ortiz, R. Sanchez, R. Sanchez-Lopez, L. Guereca, C.L. Murphy, A. Allen, J.S. Wall, D.A. Fernandez-Velasco, A. Solomon, B. Becerril, Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains, *Proteins*, 72 (2008) 684-692.

[36] A. Hassanpour, C.A. De Carufel, S. Bourgault, P. Forgione, Synthesis of 2,5-diaryl-substituted thiophenes as helical mimetics: towards the modulation of islet amyloid polypeptide (IAPP) amyloid fibril formation and cytotoxicity, *Chemistry*, 20 (2014) 2522-2528.

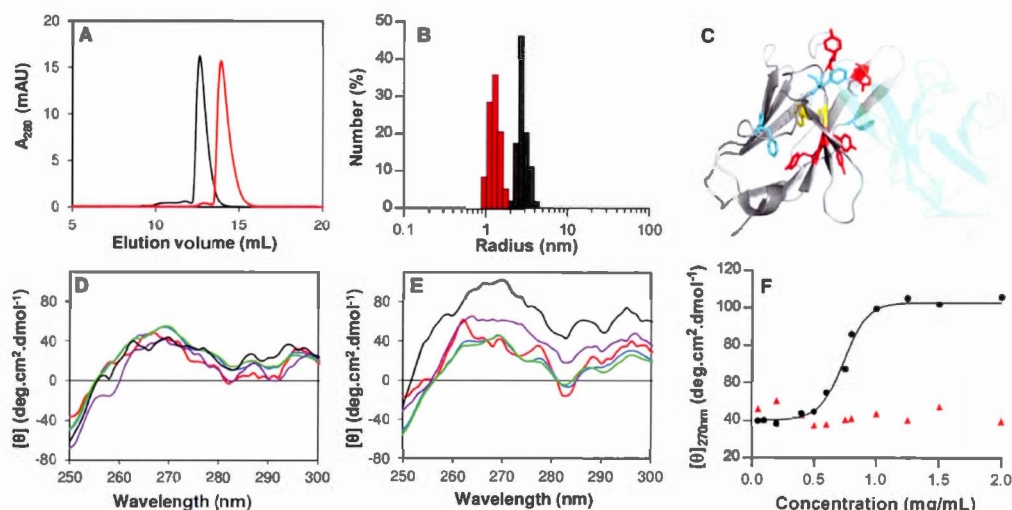
[37] A. Solomon, B. Frangione, E.C. Franklin, Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. Preferential association of the V lambda VI subgroup of human light chains with amyloidosis AL (lambda), *The Journal of clinical investigation*, 70 (1982) 453-460.

[38] M. Gonzalez-Andrade, B. Becerril-Lujan, R. Sanchez-Lopez, H. Cecena-Alvarez, J.I. Perez-Carreón, E. Ortiz, D.A. Fernandez-Velasco, L. del Pozo-Yauner, Mutational and genetic determinants of lambda6 light chain amyloidogenesis, *The FEBS journal*, 280 (2013) 6173-6183.

- [39] X. Jiang, C.S. Smith, H.M. Petrassi, P. Hammarstrom, J.T. White, J.C. Sacchettini, J.W. Kelly, An engineered transthyretin monomer that is nonamyloidogenic, unless it is partially denatured, *Biochemistry*, 40 (2001) 11442-11452.
- [40] M. Calamai, N. Taddei, M. Stefani, G. Ramponi, F. Chiti, Relative influence of hydrophobicity and net charge in the aggregation of two homologous proteins, *Biochemistry*, 42 (2003) 15078-15083.



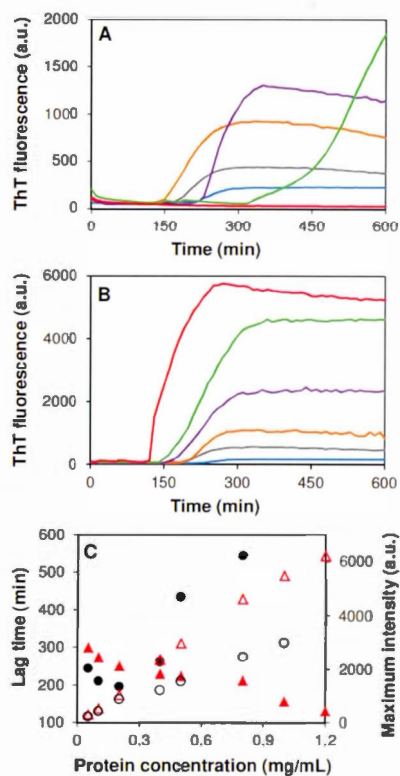
## 2.8 Figures



**Figure 2.1** Concentration-dependent dimerization of  $V_L \lambda 6$  Wil in low ionic strength solution

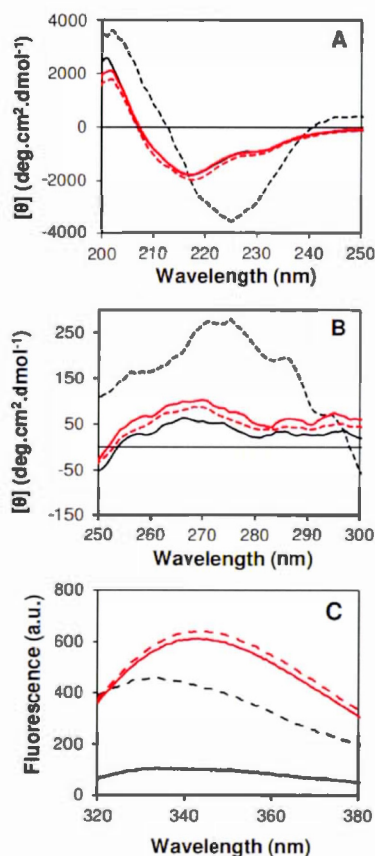
(A) Analytical size exclusion chromatograms of 1 mg/ml Wil solution in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4 (black) and in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl (red). (B) Dynamic light scattering analysis of 1 mg/mL Wil in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4 (black) and in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl (red) (C) Ribbon representation of  $V_{\lambda 6}$  LC Wil crystal structure (PDB ID: 2CD0; [22]). Trp, Phe and Tyr residues are indicated in yellow, cyan and red, respectively. (D,E) Near-UV circular dichroism spectra of Wil in (D) 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl and (E) 10 mM phosphate buffer, pH 7.4 at concentrations of 0.1 mg/mL (red), 0.4 mg/mL (blue), 0.5 mg/mL (green), 0.75 mg/mL (purple) and 1.5 mg/mL (black). (F) Transition curve of association of Wil in presence ( $\blacktriangle$ , red) and absence ( $\bullet$ , black) of 150 mM NaCl. Molar ellipticity at 270 nm as a function of Wil concentrations. The solid line represents the best non-linear curve fit to determine the association constant of Wil in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4.





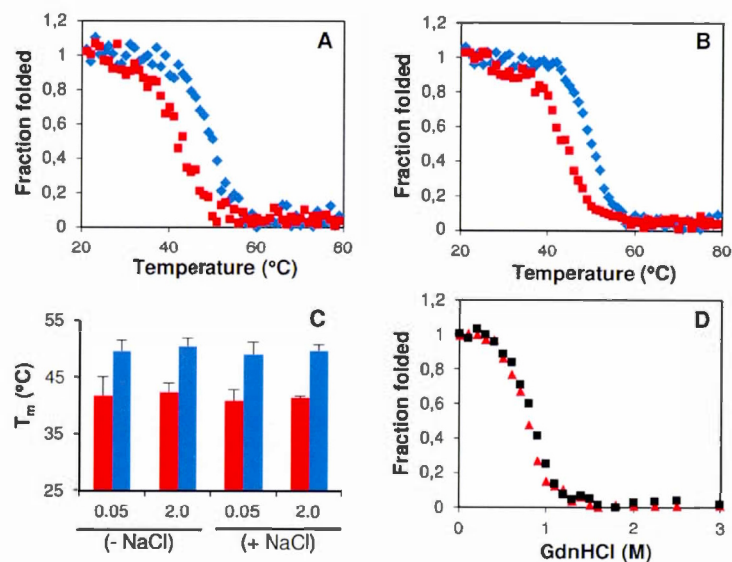
**Figure 2.2** Effect of protein concentration on the kinetics of Wil amyloid formation

Kinetics of amyloid formation of Wil in (A) low ionic (10 mM phosphate buffer, pH 7.4) and (B) high ionic strength buffer (10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl) at 37°C under constant agitation probed by ThT fluorescence intensity. (A,B) Concentrations of 0.05 mg/mL (blue), 0.1 mg/mL (grey), 0.2 mg/mL (orange), 0.4 mg/mL (purple), 0.8 mg/mL (green) and 1.0 mg/mL (red) are represented. (C) Lag time (filled) of fibril formation and maximum ThT intensity after 600 min incubation (open) as a function of protein concentration in presence (▲, red) and absence (●, black) of 150 mM NaCl.



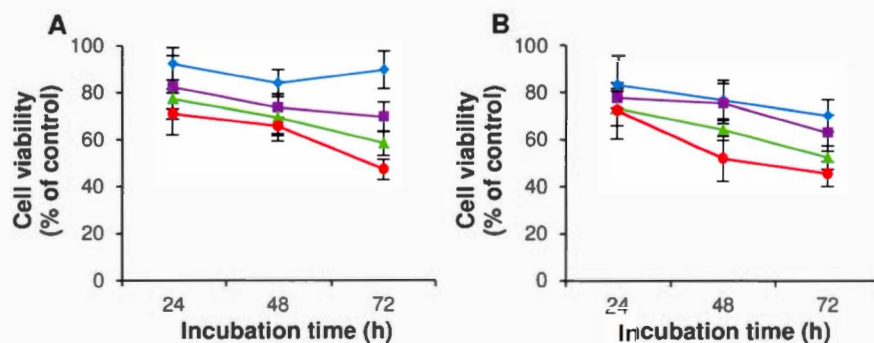
**Figure 2.3** Dimerization inhibits the conformational transition associated with amyloid formation

(A) Far-UV circular dichroism spectra of Wil at 0.05 mg/mL (black) and 2.0 mg/mL (red) in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4 before (solid line) and after (dashed line) 600 min incubation under constant agitation at 37°C. (B) Near-UV circular dichroism spectra of Wil at 0.05 mg/mL (black) and 2.0 mg/mL (red) in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4 before (solid line) and after (dashed line) 600 min incubation under constant agitation at 37°C. (C) Tryptophan fluorescence spectra of Wil at 0.05 mg/mL (black) and 2.0 mg/mL (red) before (solid line) and after (dashed line) incubation.



**Figure 2.4** Thermal and chaotropic stability of V<sub>L</sub> λ6 as a function of quaternary structure

(A,B) Thermal denaturation monitored by the mean residue ellipticity at 218 nm of Wil (■, red) and Jto (◆, blue) in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4 at a concentration of (A) 0.05 mg/mL and (B) 2.0 mg/mL. (C) Melting temperature (T<sub>m</sub>) of Wil (red) and Jto (blue) at 0.05 and 2.0 mg/mL in absence (-) or in presence of (+) of 150 mM NaCl. (D) Chemical denaturation of Wil monitored by Trp fluorescence in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, at a concentration of 0.05 mg/mL (■, black) and 2.0 mg/mL (▲, red).



**Figure 2.5** Toxicity of  $V_L \lambda 6$  on cardiomyoblasts

Toxicity of  $V_L \lambda 6$  on cardiomyoblasts. H9c2 cells were respectively treated with concentrations of (A) Wil and (B) Jto of 0.05 mg/mL (♦, blue), 0.1 mg/mL (■, purple), 0.2 mg/mL (▲, green) and 0.4 mg/mL (●, red) for 24 to 72 h. Cell viability was measured by the resazurin reduction assay and compared to cells treated with vehicle only (100% cell viability).



## 2.9 Supporting information

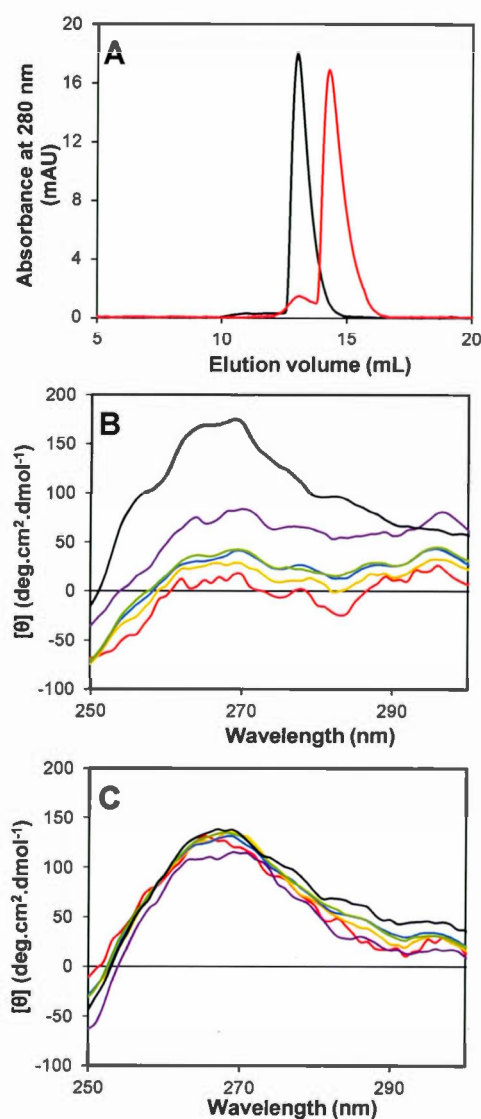
### Supporting Information

#### Probing the role of $\lambda 6$ immunoglobulin light chain dimerization in amyloid formation

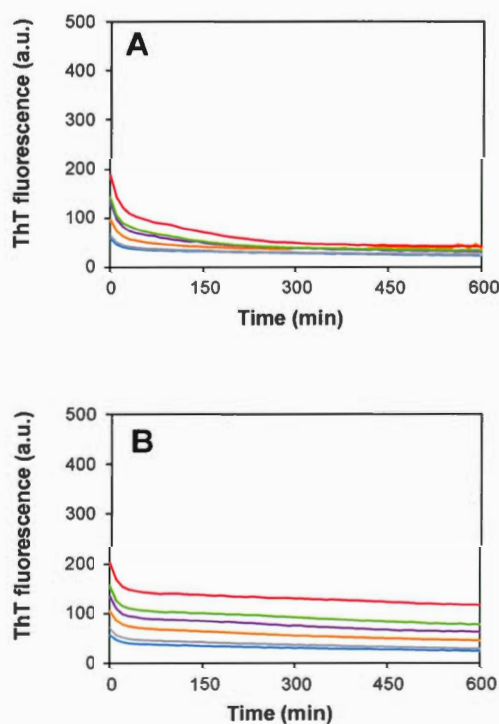
Mathieu Laporte Wolwertz<sup>a,b</sup>, Phuong Trang Nguyen<sup>a,b</sup>, Noé Quittot<sup>a,b</sup> and Steve Bourgault<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>*Department of Chemistry, Pharmaqam, University of Québec in Montreal, Montreal, QC, Canada, H3C 3P8*

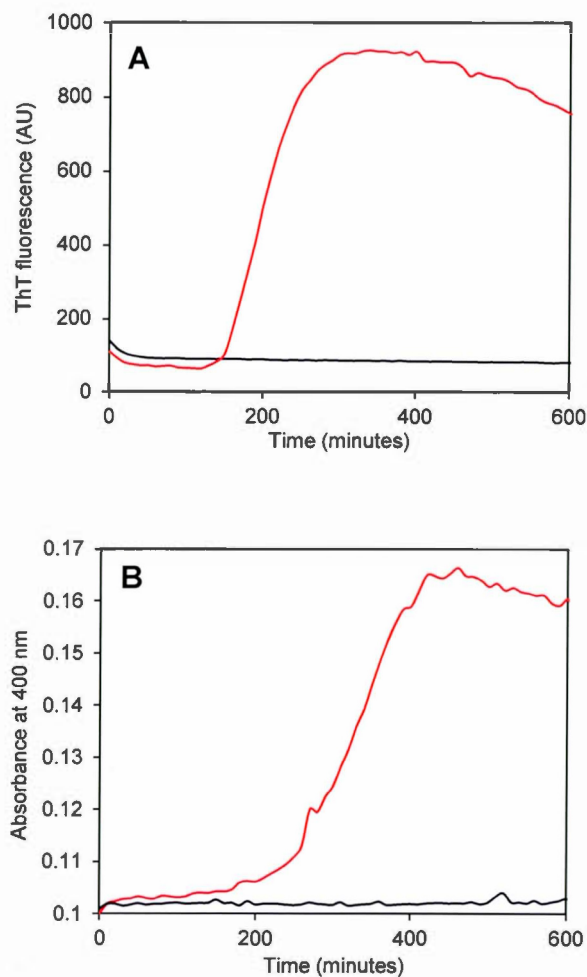
<sup>b</sup>*Quebec Network for Research on Protein Function, Structure, and Engineering, PROTEO*



**Figure S1:** Concentration-dependent dimerization of  $V_L \lambda 6$  Jto in low ionic strength solution. (A) Analytical size exclusion chromatograms of 1 mg/ml Jto solution in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4 (black) and in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl (red). (B,C) Near-UV circular dichroism spectra of Jto in (B) 10 mM phosphate buffer, pH 7.4 and (C) 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl, at concentrations of 0.1 mg/mL (red), 0.4 mg/mL (blue), 0.5 mg/mL (green), 0.75 mg/mL (purple) and 1.5 mg/mL (black).

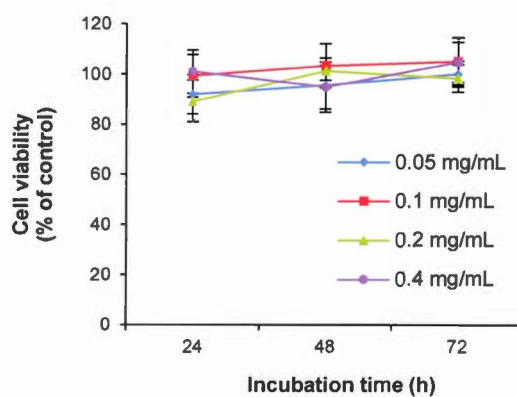


**Figure S2:** Effect of protein concentration on the kinetics of Jto amyloid formation. Kinetics of amyloid formation of Jto in (A) low ionic (10 mM phosphate buffer, pH 7.4) and (B) high ionic strength buffer (10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl) at 37°C under constant agitation probed by ThT fluorescence intensity. (A,B) Concentrations of 0.05 mg/mL (blue), 0.1 mg/mL (grey), 0.2 mg/mL (orange), 0.4 mg/mL (purple), 0.8 mg/mL (green) and 1.0 mg/mL (red) are represented.



**Figure S3:** (A) Kinetics of amyloid formation of Wil (red) and Jto (black) in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, at 37°C under constant agitation, at a concentration of 0.1 mg/ml protein, probed by ThT fluorescence intensity. (B) Kinetics of aggregation of Wil (red) and Jto (black) in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, at 37°C under constant agitation, at a concentration of 0.1 mg/ml, monitored by turbidity at 400 nm.





**Figure S4:** Toxicity of Wil fibrillar aggregates on cardiomyoblasts. H9c2 cells were treated with concentrations of pre-formed Wil aggregates ranging from 0.05 to 0.4 mg/mL for 24 to 72 h and cell viability was measured by the resazurin reduction assay and compared to cells treated with vehicle only (100% cell viability).

## CHAPITRE III

### EFFECTS OF OXIDATIVE STRESS-INDUCED POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS ON THE AMYLOIDOGENICITY AND CARDIOTOXICITY OF $\lambda$ 6 IMMUNOGLOBULIN LIGHT CHAIN

Mathieu Laporte Wolwertz<sup>a,b</sup>, Jonathan Kemp-Bouchard<sup>a,b</sup>, Makan Golizeh<sup>a</sup>, Leanne Ohlund<sup>a</sup>, Lekha Sleno<sup>a</sup> and Steve Bourgault<sup>a,b\*</sup>

*<sup>a</sup>Department of Chemistry, Pharmaqam, University of Québec in Montreal, Montreal, QC, Canada, H3C 3P8*

*<sup>b</sup>Quebec Network for Research on Protein Function, Structure, and Engineering, PROTEO*

**\*Corresponding author:**

Pr. Steve Bourgault,

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succursale Centre-Ville

Montréal (Québec), H3C 3P8, Canada

1-514-987-3000 (5161)

[bourgault.steve@uqam.ca](mailto:bourgault.steve@uqam.ca)

### 3.1 Résumé

L'amyloïdose à chaînes légères (AL) résulte de la surproduction de chaînes légères d'immunoglobuline (LC) puis de leur dépôt sous forme de fibres amyloïdes et d'agrégats amorphes dans l'espace extracellulaire d'organes vitaux. Malgré le fait que l'implication de modifications post-traductionnelles (PTMs) dans plusieurs maladies amyloïdes a été démontrée, très peu de choses sont connues au sujet de leur impact sur la stabilité et l'amyloïdogénicité des LCs. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'impact de trois PTMs, soit la carbonylation par l'hydroxynonéal (HNE), l'oxydation et la nitration, sur l'amyloïdogénicité, la stabilité thermodynamique et la structure de Wil, un domaine variable de LC de la lignée  $\lambda 6$ . Nos résultats montrent que la carbonylation et la nitration de Wil influencent sa propension à former des agrégats et des fibres en conditions physiologiques. Des analyses par spectroscopie CD et par dénaturation thermique ont indiqué que la carbonylation a modifié les changements structuraux qui entraînent le processus d'agrégation et a mené à la formation d'agrégats majoritairement amorphes. Par contre, la nitration a engendré la formation d'agrégats fibrillaires et son effet sur l'amyloïdogénicité découle principalement d'une réduction de la stabilité thermodynamique. L'oxydation de Wil n'a eu aucun effet sur son amyloïdogénicité et sur sa stabilité. Malgré le fait que Wil a été modifié facilement et intensément par ces traitements *in vitro*, les PTMs n'ont affecté son amyloïdogénicité que modérément, ce qui suggère que Wil est résilient à cet égard. Cette étude renforce la notion que dans le contexte de l'AL, la stabilité thermodynamique et les changements structuraux doivent tous deux être considérés lors de l'évaluation de l'amyloïdogénicité de domaines variables de chaînes légères.

### 3.2 Abstract

Light chain amyloidosis (AL) arises from the overproduction of immunoglobulin light chains (LC) followed by their deposition as amyloid fibrils and amorphous aggregates in the extracellular space of vital organs. Although non-enzymatic post-translational modifications (PTMs) have been implicated in several amyloid diseases, very little is known about their impact on LC stability and amyloidogenicity. In this study, we investigated the impact of three oxidative PTMs, namely carbonylation by hydroxynonenal (HNE), oxidation and nitration, on the amyloidogenicity, thermodynamic stability and structure of Wil, a LC variable domain of the  $\lambda 6$  germline. Our results showed that carbonylation and nitration of Wil affects its propensity to form aggregates and fibrils under physiological conditions. CD spectroscopy and thermal unfolding analyses indicated that carbonylation altered the structural changes driving the aggregation process and led to the formation of predominantly amorphous aggregates. In contrast, nitration led to the formation of fibrillar aggregates and its effect on amyloidogenicity could be ascribed to a decrease in thermodynamic stability. Oxidation of Wil had no effect on its amyloidogenicity and stability. Although Wil can readily be chemically modified, these PTMs moderately affected its amyloidogenicity, suggesting that Wil is rather resilient. This study reinforces the notion that both the thermodynamic stability and the structural properties must be considered when evaluating the amyloidogenicity of a light chain variable domain in the context of AL.

### Keywords

Amyloid; Light chain amyloidosis; Immunoglobulin; Aggregation; Oxidative stress; Post-translational modifications



### 3.3 Introduction

Light chain amyloidosis (AL) originates from the systemic deposition of immunoglobulin light chain (LC) proteins following their hypersecretion by an abnormally proliferative clonal population of B cells [1]. Under non-pathological conditions, two mature LCs associate with two mature heavy chains (HCs) to form a heterotetramer which is then secreted as a complete immunoglobulin molecule into blood circulation. In patients afflicted with AL, LCs not complexed with HCs are secreted, then misfold and self-assemble into amyloid fibrils. LC protein deposition in the extracellular space of vital organs, such as the kidneys, the heart and the liver, leads to organ failure and, eventually, to death [1-3]. Although the mechanisms of light chain aggregation are not fully understood, the process is generally associated with conditions that lead to light chain overproduction, such as multiple myeloma [4]. Patients afflicted with AL have amyloid fibrils predominantly constituted of the LC variable domain ( $V_L$ ), sometimes coupled with a short fragment of the constant domain [5]. For this reason, most *in vitro* and *in vivo* studies on AL focus their attention on the variable domains of amyloidogenic light chains. Due to the presence of multiple germline donor sequences and somatic hypermutation occurring during B cell maturation, there is wide sequence diversity in AL light chains. Unlike other amyloid diseases where a common protein sequence with a few familial variants is implicated, each AL patient has a unique protein sequence [6]. However, the sequences are still closely related since proteins that are the product of certain light chains variable region ( $V_L$ ) gene segments are highly overrepresented in AL [7-11], in particular  $V\lambda 6a$ , the single gene that encodes  $\lambda 6$  proteins [12]. Multiple reports have shown that decreased thermodynamic stability of a LC variable domain is linked to its propensity to self-assemble into amyloid fibrils, most likely due to the population of partially folded states [13-17]. Certain amino acid substitutions at specific sites within the LC variable domain are thought to decrease protein stability, leading to misfolding and increased amyloidogenicity *in vitro* [13, 14, 17-19].

Over the course of their biological life, proteins are cumulatively subjected to irreversible non-enzymatic post-translational modifications (PTMs) which are responsible for their molecular aging. Non-enzymatic PTMs of proteins are associated with different cellular processes, most notably oxidative stress. Reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) are known to react with susceptible amino acid residues of proteins, inducing various chemical modifications. These PTMs include conversion of methionine to methionine sulfoxides [20] and conversion of tyrosine to 3-nitrotyrosine [21]. Furthermore, aldehyde by-products of lipid peroxidation such as 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) readily bind to protein nucleophiles, resulting in the formation of protein adducts [22]. It is well established that oxidative PTMs have profound biological and pathological significance [23]. For instance, oxidative protein damages are associated with numerous protein misfolding diseases, including Alzheimer's disease [24], Parkinson's disease [25] and various systemic amyloidosis [26]. Oxidative protein modifications can affect dramatically the physico-chemical properties and/or the stability of a given amyloidogenic protein, modulating its propensity to self-assemble and deposit as insoluble aggregates.

Over the last two decades, numerous studies have investigated the contributions of the primary structure and the thermodynamic stability on the amyloid formation propensity of LCs. However, little is known on the significance of non-enzymatic PTMs on the stability, misfolding and aggregation propensity of LCs in the context of AL. A recent study has reported that the aggregation of human LCs  $\kappa$ -( $\kappa$ -MJM) and  $\lambda$ -( $\lambda$ -L155) can be accelerated *in vitro* when they are incubated in presence of lipid-derived aldehydes, such 4-hydroxynonenal (HNE), and glyoxal (GLY) [27]. This same study also showed that the aldehyde-induced aggregation could be associated with alteration of protein secondary structure, leading to an increase in  $\beta$ -sheet conformation [27]. Besides, the effects of methionine oxidation on the structural properties, conformational stability and aggregation propensity have been addressed for the LC variable domain  $\kappa$ IV LEN, which derived from a patient suffering from

multiple myeloma. This report showed that while the protein was well-protected from oxidation in its native state, oxidation in the presence of a denaturing agent induced noticeable structural changes and destabilization of LEN [28]. The methionine-oxidized LEN formed amorphous aggregates under conditions in which the unmodified protein assembles into fibrils [28]. Thus, apart these two studies, there is an evident lack of knowledge regarding the effects of oxidative modifications on the aggregation propensity of LC proteins. Considering the high heterogeneity of the amyloidogenic precursor in AL, it is important to address if these observed effects can be transposed to others LCs.

We thus addressed the role of oxidative stress-induced PTMs on LC protein from the  $\lambda 6$  germline. We focused on a LC protein sequence that derives from a patient, Wil, who suffered from AL with renal amyloid deposits [13]. This LC V<sub>L</sub> is a thermodynamically unstable and fibrillogenic-prone protein composed of 111 amino acids residues and encompasses 11 somatic mutations [17, 29]. In this study, we successively focused on three PTMs, namely protein carbonylation by HNE, oxidation and nitration. We observed that carbonylation and nitration of Wil affects its propensity to form aggregates and fibrils under physiological conditions. While carbonylation altered the structural changes driving the aggregation process and led to the formation of predominantly amorphous aggregates, nitration led to the formation of fibrillar aggregates and its effect on amyloidogenicity was mainly the result of a decrease in thermodynamic stability.



### 3.4 Methods

#### *Cloning, expression and purification of Wil V<sub>λ</sub>6 protein*

The gene encoding the variable domain of Wil immunoglobulin light chain protein (Life technologies, Carlsbad, CA) was cloned into pet22b(+) plasmid (Novagen, San Diego, CA). The resulting clone was transformed into *E.coli* BL21 (DE3) competent cells (Novagen). The protein was expressed in BL21(DE3) cells as previously described [13]. Cells were harvested and resuspended in 0.4 volume of 30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 20% sucrose, pH 8. The solution was stirred slowly at room temperature for 10 min. Cells were collected by centrifugation at 4°C for 10 min at 7,000 g and resuspended in 0.4 volume of ice-cold 5 mM MgSO<sub>4</sub>. Cell suspension was stirred slowly for 15 min on ice, and centrifuged as described above. The obtained periplasmic fraction was lyophilised before being resuspended in 10 mM phosphate buffer pH 7.4 with 150 mM NaCl. Protein was purified by size exclusion chromatography (SEC; HiLoad 16/600 Superdex 75 column) in 10 mM phosphate buffer pH 7.4, 150 mM NaCl. The purity of each fraction was verified by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and LC-MS-TOF. Protein concentrations were determined by measuring the absorbance at 280 nm, using a theoretical molar extinction coefficient of 12950 M.cm<sup>-1</sup> for Wil.

#### *Induction of oxidative PTMs*

To induce oxidation, Wil samples (80 μM) were incubated with 3% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich) in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl at room temperature (RT) for 1 hour. The control sample for oxidation was prepared by replacing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with water. Nitration was performed by treating Wil samples (80 μM) with 20 mM tetranitromethane (TNM, Sigma-Aldrich) at RT for 4 hours. The control sample for nitration was prepared by incubating Wil solutions (80 μM) at RT for 4 hours. HNE-Wil was generated by incubating Wil samples (80 μM) with HNE



(Sigma-Aldrich) with a final concentration corresponding to a molar ratio of 30:1 (HNE:Wil) in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl for 18 hours at 4°C or room temperature. The control samples for HNE-Wil (4°C and RT) were prepared by replacing HNE with an equal volume of ethanol, the solvent in which HNE is dissolved. Unreacted H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TNM or HNE were removed by gel filtration on a Superdex 75 column equilibrated with 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl. All control samples were also subjected to this purification step. Modification of Wil was confirmed by liquid-chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (LC/MS-TOF).

*Detection of PTMs by mass spectrometry (MS) analysis*

Wil protein (treated species and control, 40 nmol) was solubilized in 2% TFA in 20% methanol and digested using pepsin (enzyme-to-protein ratio 1:40 w/w) at a total volume of 400 µL overnight (37°C, pH 2 – 2.5). Digestion was stopped by adding 500 µL water and the digest was cleaned up on a 1 cc (30 mg) Oasis<sup>®</sup> hydrophilic-lipophilic balanced (HLB) SPE cartridge (Waters, Milford, MA) with 100% methanol elution (1 mL). Eluate was evaporated under vacuum (Thermo Fisher Scientific Universal Vacuum System, Asheville, NC) and stored at –30 °C. Sample was reconstituted in 10% acetonitrile (100 µL) and injected (20 µL) onto an Aeris PEPTIDE XB-C18 100 × 2.1 mm column, with solid core 1.7 µm particles (100 Å) (Phenomenex, Torrance, CA) using a Nexera UHPLC system (Shimadzu, Columbia, MD) with water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% formic acid, at a flow rate of 300 µL/min (40 °C). The gradient started at 5% B, held for 2.5 min, and was linearly increased to 30% B at 24 min, to 50% B at 26 min, then to 85% B at 26.5 min. MS and MS/MS spectra were collected on a high-resolution quadrupole-time-of-flight (Q-TOF) TripleTOF 5600 mass spectrometer (AB Sciex, Concord, ON) equipped with a DuoSpray ion source in positive ion mode set at 5 kV source voltage, 500°C source temperature and 50 psi for GS1/GS2 gas flows, with a declustering

potential of 80 V. The instrument performed a survey TOF-MS acquisition from  $m/z$  120–1250 (250 ms accumulation time), followed by MS/MS on the 15 most intense precursor ions from  $m/z$  250–1250 (excluded for 20 seconds after two occurrences) using information-dependent acquisition (IDA) with dynamic background subtraction. Each MS/MS acquisition had an accumulation time of 50 ms and collision energy of  $30 \pm 10$  V. The total cycle time was 1.05 s. MS/MS data were searched against a user-created file by ProteinPilot™ software using Paragon™ algorithm with a detection protein threshold of unused ProtScore > 0.05 (confidence >10%). The search was performed for +1 to +4 charge states at a MS tolerance of 0.05 Da on precursor ions and 0.1 Da on fragments. Detected modified peptides were confirmed upon exact mass and charge state and being absent in the control sample using PeakView™ software. A list including the retention time and  $m/z$  values of the verified peptides was created and samples were re-injected for higher quality MS/MS data. Second IDA analysis was performed for the 4 most intense precursor ions (excluded after three occurrences) with an MS/MS accumulation time of 150 ms and a total cycle time of 0.9 s.

#### *Circular dichroism (CD) spectroscopy*

CD measurements were performed using a Jasco J-815 spectropolarimeter (Jasco, Easton, MD). Far-UV spectra (250–200 nm) were collected in a 2-mm path-length cell while near-UV spectra (320–250 nm) were collected in a 10-mm path-length cell, with a protein concentration of 0.2 mg/ml in both cases. The wavelength step was set at 1 nm with a scanning speed of 20 nm/min. All assays were performed in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl. Blanks were subtracted and the raw data was converted to mean residue ellipticity (MRE):

$$\text{MRE} = \frac{\text{Mean residue weight (g. mol}^{-1}\text{)} \times \text{CD signal (deg)}}{10 \times \text{pathlength (cm)} \times \text{protein concentration (g. ml}^{-1}\text{)}}$$

Thermal denaturation experiments were performed by measuring the ellipticity at 218 nm over a temperature range of 4 to 80 °C. Temperature was increased by 1.0°C/min. Assuming a two-state folding mechanism, the fraction of the folded conformation ( $F_f$ ) was obtained using the following formula:

$$F_f = (y - y_u) / (y_f - y_u)$$

where  $y_f$  and  $y_u$  represent the ellipticity signal at 218 nm characteristic of the folded and unfolded conformations, respectively, whereas  $y$  correspond to the value measured at the indicated temperature. The values of  $y_f$  and  $y_u$  were obtained by linear regression of the data before and after the unfolding transition, respectively. A sigmoidal curve-fit was used to obtain the  $T_m$ , *i.e.* the midpoint of the denaturation transition.

#### *Amyloid formation kinetics measured by Thioflavin T fluorescence*

Assays were performed at 37°C in sealed black-wall, clear-bottom 96-well polystyrene non treated microplates (Corning, New York), with a total volume of 85 µl per well and a concentration of 40 µM thioflavin T (ThT). The final concentration of protein was 0.1 mg/ml in 10 mM phosphate buffer pH 7.4, 150 mM NaCl. ThT fluorescence was measured every 10 minutes over the course of 24 h, with constant orbital stirring between reads, using a SpectraMax i3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) plate reader. The fluorescence, with excitation at 440 nm and emission at 485 nm, was measured from the bottom of the well. For each experiment, control reactions (without protein) were carried. Data obtained from triplicate wells were averaged, corrected by subtracting the corresponding control reaction, and plotted as fluorescence versus time. Data of time-dependence of ThT fluorescence were fitted to a sigmoidal growth model where  $T_{50}$  is the time required to reach half of the fluorescence intensity,  $k$  is the apparent first-order constant and  $Y_{max}$  and  $Y_0$  are, respectively, the maximum and initial fluorescence values:



$$Y = Y_0 + (Y_{\max} - Y_0)/(1 + \exp(-(T - T_{50})/k))$$

The lag time, *i.e.* the time before detectable amyloid formation occurs, as predicted by means of the nucleation dependent polymerization model, is described as  $T_{50} - 2/k$ . Data presented are the average of at least three independent experiments performed in triplicate.

### 3.5 Results and discussion

#### *In vitro oxidative stress-induced modifications*

To investigate the roles of oxidative-related PTMs on the amyloidogenicity of  $\lambda 6 V_L$ , we initially derived recombinant Wil protein with known reactive compounds before re-purifying the modified protein for MS characterization and biophysical analysis. HNE-modification, tyrosine nitration and oxidation of Wil were achieved by treating recombinant Wil with HNE, TNM and hydrogen peroxide, respectively. To confirm the PTMs and assess the extent of modifications, treated Wil samples were initially analyzed by liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (LC/MS-TOF). Identification of specific residue side chain modifications were performed by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC/MS/MS) after pepsin digestion. Protein modification by HNE usually involves the 1,4-addition (Michael addition) of the nucleophilic groups of Cys, His or Lys side chains onto the electrophilic double bond of HNE, leading to an increase in the protein's molecular weight of 156 Da for each HNE molecule added. Occasionally, the amine group of Lys side chains can also be modified by HNE via Schiff-base formation, which yields an increase of 138 Da in molecular weight as this reaction involves the loss of a water molecule. However, Michael adducts generally represent more than 99% of HNE protein modifications [30, 31]. There are four histidine residues (His<sup>8</sup>, His<sup>35</sup>, His<sup>54</sup> and His<sup>96</sup>) in the sequence of Wil that are susceptible for HNE-mediated Michael addition (Table 3.1). Treatment of Wil  $V_L$



with HNE was performed under two conditions. One treatment was performed at 4°C while the other one was done at room temperature (RT). In both cases, the protein was incubated with 30 molar equivalent of HNE for 18 hours. Analysis by LC/MS-TOF of Wil solutions treated at 4°C showed that a majority of the protein was modified, with a 156 Da increase in molecular weight (Fig. 3.1A), revealing that one HNE molecule was added to the protein via Michael addition. After pepsin digestion, LC/MS/MS analysis revealed that His<sup>54</sup> was the single residue with an HNE adduct (Table 3.1). Cys and Lys residues were not modified by this treatment. Similar results have been reported for the Parkinson's disease related protein  $\alpha$ -synuclein, as His<sup>50</sup> has been identified as the primary target for HNE modification [32, 33].

LC/MS-TOF analysis of Wil solutions treated with HNE at RT for 18 hours revealed major modifications of the protein (Fig. 3.2B). As a matter of fact, most of the proteins contained two modifications acquired through Michael addition, with a 312 Da increase in molecular mass. The second most abundant protein species contained one HNE molecule added (+156 Da) and a small proportion of Wil had three HNE adducts (+468 Da). All modifications occurred through Michael addition. LC/MS/MS analysis of the pepsin digested sample actually showed that all four His residues had been modified by HNE (Table 3.1), but with varying intensities. As anticipated from the treatment at 4°C, His<sup>54</sup> was the most intensely modified residue. Clearly, His<sup>54</sup> is the residue with the most reactivity towards HNE, most likely because of its accessibility in the protein fold and of an absence of steric hindrance [34]. His<sup>8</sup> was the second most intensely modified residue while His<sup>96</sup> was the least intensely modified. As it was the case for the treatment at 4°C, Cys and Lys residues were not modified with HNE adducts. Obviously, the reactivity of histidine residues towards HNE appears to be much higher at room temperature than it is at 4°C.

Nitration of Tyr phenolic group is characterized by an increase of 45 Da in molecular mass following the formation of a 3-nitrotyrosine. Wil encompasses five candidate

tyrosine residues; Tyr<sup>33</sup>, Tyr<sup>37</sup>, Tyr<sup>89</sup>, Tyr<sup>90</sup> and Tyr<sup>94</sup>. LC/MS-TOF analysis shows that the treatment of Wil with TNM led to severe modifications of Wil molecular weight. Unmodified protein was barely detected upon a 4 h treatment with 20 mM TNM (Fig. 3.1C). The proteospecies that were obtained had between one and four modifications (45 to 180 Da mass increase), and proteins with four modifications were the most abundant. Pepsin digestion followed by LC/MS/MS analysis revealed that Tyr<sup>90</sup> was the only candidate residue which was never modified following the treatment with TNM (Table 3.1). Globally, all other tyrosine residues were equally modified. This could be explained by the fact that Tyr<sup>37</sup> is a direct neighbor to Tyr<sup>90</sup> in the protein fold and is more accessible for nitration than Tyr<sup>90</sup> (PDB ID: 2CD0, [34]). The presence of a previously nitrated Tyr<sup>37</sup> probably offers some protection from nitration to Tyr<sup>90</sup> by steric hindrance. The high efficiency of Wil tyrosine nitration and histidine HNE-modification is likely due to the solvent accessibility of these residue side chains, which increases the probability for reaction. The high efficiency of Wil nitration under these specific conditions, in comparison to other proteins with a similar size and number of Tyr residues, is interesting. For instance, the RNase A (14 kDa) protein, which contains six tyrosine residues, was nitrated almost exclusively at Tyr<sup>115</sup> [35]. Other factors that may promote nitration of Wil include the absence of steric hindrance and the presence of negative charges in the vicinity of the tyrosine side chains [35]. Specifically, aspartate residues are direct neighbors of Tyr<sup>89</sup> and Tyr<sup>94</sup>. Thus, the high nitration level of Wil might reflect a specific structural organization within the protein; including the presence of several solvent exposed Tyr.

Wil sequence used in this study contains three thiol residues sensitive to oxidation, one non-native Met residue at position 1 and two Cys at positions 23 and 88. These two Cys are oxidized to form a disulfide bond in the native structure of the protein. Methionine is easily oxidized to methionine sulfoxide by two-electron oxidations induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, among other biological oxidants, yielding a molecular mass

increase of 16 Da [36]. LC/MS-TOF analysis revealed that the treatment of Wil with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> led to a very strong modification of the protein with no unmodified protein detected (Fig. 3.1D). As expected, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated sample showed a single component with a 16 Da increase in molecular mass. By LC/MS/MS analysis, we observed that only the Met<sup>1</sup> residue was oxidized. Thus, the disulfide bridge protected Cys residues from oxidation whereas the non-native Met residue was highly prone to oxidation.

#### *Impact of PTMs on the kinetics of amyloid formation*

It has been shown that oxidative stress-induced PTMs such as HNE-modification, oxidation and nitration can modulate the kinetics of fibril formation of several amyloidogenic polypeptides, including the tau protein, the A $\beta$  peptide and  $\alpha$ -synuclein [37-42]. To address the impact of these modifications on the amyloidogenicity of  $\lambda$ 6 LCs, we used the thioflavin T (ThT) assay to monitor the kinetics of fibril formation. The fluorescence emission of ThT increases dramatically upon binding to protein aggregates rich in cross- $\beta$ -sheet structure which is characteristic of amyloid fibrils [43]. As for the MS analysis, all proteins were re-purified by SEC before the fibrillization assays to eliminate the unreacted reagents that could interfere with the signal and to remove any possible aggregates that could have been formed during oxidative treatment. Unmodified Wil V<sub>L</sub> readily formed ThT positive aggregates under the conditions used in our assay (Fig. 3.2), *i.e.* constant agitation at 37°C in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl and a protein concentration of 0.1 mg/mL. For native Wil, a T<sub>50</sub>, *i.e.* the time required for the ThT signal change to reach half its maximal value, of 216  $\pm$  12 min was observed (Table 3.2). The kinetics of aggregation was significantly slower for HNE-Wil (4°C) than for its respective control, with a lag time of 377  $\pm$  34 min (Fig. 3.2, Table 3.2). Thus, incorporation of a HNE adduct on residue His<sup>54</sup> slowed down amyloid formation and led to aggregates with reduced ThT-binding capacity. It is worth

mentioning that this sample contained a mixture of unmodified and modified (+1 HNE) Wil proteins (Fig. 3.1A), thus the inhibitory effect of HNE conjugation on amyloid formation might be underestimated. In contrast, Wil modified at several sites with HNE, HNE-Wil (RT), displayed faster aggregation kinetics (Fig. 3.2, Table 3.2). Interestingly, while the nucleation step was significantly shortened, the maximal ThT intensity reached at the plateau was half of the one observed for untreated Wil. These data suggest that a high level of HNE conjugation accelerated the formation of aggregates with lower ThT-binding capacity, indicative of less structurally ordered species. It has been observed that the kinetics of amyloid formation of  $\kappa$ -MJM and  $\lambda$ -L155 V<sub>L</sub> were considerably accelerated by the presence of HNE, yielding a seeded-type aggregation process with no lag phase [27]. However, in contrast to the present study, these ThT assays have been performed with unmodified protein incubated with HNE during the amyloidogenic reaction and the extent of HNE modification has not been evaluated in this report.

Nitration of Tyr residues by TNM treatment led to Wil derivatives that exhibited a shorter lag phase and a lower maximum intensity of the ThT signal (Table 3.2). As the absorbance spectra of 3-nitrotyrosine displays a major peak between 400 and 460 nm [44], this lower ThT signal could be attributed to the absorbance of 3-nitrotyrosine at 440 nm, the excitation wavelength used in the ThT assay. However, increasing ThT concentration up to 100  $\mu$ M and/or modifying protein concentrations did not alter the lower fluorescence signal obtained at the plateau in comparison to the unmodified protein. Finally, oxidation of Met<sup>1</sup> did not affect the kinetics of amyloid formation, with T<sub>50</sub>, lag phase and maximum intensity of o-Wil being equivalent to the unmodified protein (Table 3.2). It has been observed that oxidation of Met<sup>4</sup> to methionine sulfoxide of the V<sub>L</sub> LEN protein leads to the formation of amorphous aggregates under conditions that usually favor amyloid formation [28]. However, in the crystal structure of LEN, Met<sup>4</sup> is embedded within a hydrophobic core [45] and its oxidation has led to changes in the secondary and tertiary structures



of the protein [28]. In contrast, Met<sup>1</sup> in Wil is solvent exposed [34] and its oxidation, most likely, does not affect its conformation, a hypothesis that we addressed below.

*Changes in the native structure of Wil induced by oxidative stress-induced PTMs*

Several studies have indicated that the self-assembly of LC proteins is triggered by the formation of partially folded, or misfolded, intermediates under destabilizing conditions, *i.e.* acidic pH, presence of detergent and/or constant agitation [6]. Thus, we evaluated if the modulation of the fibrillization kinetics observed for modified Wil species could be attributed to conformational changes induced by these non-enzymatic PTMs. To address this question, we initially used far-UV and near-UV CD spectroscopy. Wil is a protein rich in  $\beta$ -sheets that displays the classical  $\beta$ -sandwich immunoglobulin fold [34]. As observed in Fig. 3.3A, the far-UV CD spectrum of unmodified native Wil was characterized by two minima (218 nm and 233 nm). Interestingly, both HNE-treated Wil samples displayed similar far-UV spectra, with the two minima and a single positive maximum at around 202 nm, although the signal intensity was significantly reduced for Wil modified at all four sites, *i.e.* treated at room temperature. Thus, conjugation of HNE onto Wil residues side chain did not affect significantly the secondary structure of Wil. In contrast, Tyr nitration of Wil led to an increase of the degree of random coil structure with a noticeable shift of the 218 nm minima to 214 nm and a sharp increase in the negative ellipticity (Fig. 3.3A). Moreover, the minimum at 233 nm, which is attributed to the presence of aromatic clusters, appeared more diffuse. Conversion of Met<sup>1</sup> side chain to sulfoxide did not affect the secondary structure of the protein, consistent with the position of this residue at the random coil N-terminus.

We then probed the changes in the tertiary structure of Wil induced by these PTMs by near-UV CD spectroscopy. The spectrum of unmodified native Wil was characterized by the presence of three maxima at 270, 285 and 295 nm (Fig. 3.3B). The 255-270 nm region is mostly attributed to Phe residues, the 270-285 nm band is mainly

ascribed to Tyr residues whereas the peak around 295 nm arises from Trp [46]. Conjugation of a single HNE molecule at position His<sup>54</sup> as well as oxidation of Met<sup>1</sup> led to CD spectra somewhat similar to the unmodified Wil, suggesting that these PTMs did not affect the tertiary structure of the protein. Similarly to far-UV CD analysis, incorporation of HNE on all His residues groups affected the overall intensity of the signal. In contrast, tyrosine oxidation into 3-nitrotyrosine led to a unusual near-UV CD spectra, indicating that the environment and/or the mobility of aromatic residues, perhaps the tertiary structure, are affected by this PTM. However, this spectrum is difficult to interpret as the incorporation of a nitro group at position 3 of Tyr side chain affects drastically the absorbance spectra and the optical activity of the protein.

#### *Effects of oxidative stress-induced PTMs on thermodynamic stability*

It has been shown that the amyloidogenicity of LC V<sub>L</sub> correlates closely with the conformational stability of the protein; *i.e.* that the amyloid formation propensity of a given germline increases with decreased thermodynamic stability. Thus, the accelerating effects of Tyr nitration and HNE covalent addition could be related to a decrease in the stability of the protein. Thus, the stabilities of native Wil and its modified counterparts were evaluated by thermal denaturation followed by the ellipticity at 218 nm, the characteristic signal of  $\beta$ -sheet-rich structure. Native unmodified Wil showed a thermal unfolding midpoint ( $T_m$ ), *i.e.* the temperature at which both the folded and the unfolded states are equally populated, of  $41.9 \pm 0.3$  °C. HNE-functionalized Wil at 4°C (1 site of modification) and at RT (1 to 4 sites of modification) displayed a  $T_m$  similar to unmodified Wil (Fig. 3.4). Thus, the accelerating effect of HNE conjugations could not be ascribed to a decrease of the thermodynamic stability. Similarly, oxidation of Met<sup>1</sup> did not affect the thermal unfolding point of Wil. In contrast, nitration of up to four Tyr residues led to a decrease of the  $T_m$  to  $38.8 \pm 0.6$  °C, indicating that oxidation of Tyr into 3-

nitrotyrosine reduced the thermal stability of Wil and could contribute to the increased amyloidogenicity of n-Wil.

*Effects of PTMs on the structural properties of the resulting fibrils*

As revealed by ThT fluorescence assays, incorporation of oxidative-related PTMs on Wil, such as HNE-carbonylation and nitration, led to proteospecies with lower ThT-binding capacity, suggesting that these modifications induced the formation of aggregates with poor amyloid-like properties. Thus, we investigated if oxidative stress-induced PTMs can affect the structure and the morphology of the resulting fibrillar aggregates. As previously reported,  $\lambda 6$  V<sub>L</sub> ThT-positive aggregates assembled under constant agitation at physiological pH are massive and heterogeneous, making their analysis by atomic force and electron microscopy very challenging. Thus, we probed if these modifications could induce possible structural rearrangements within the aggregates by CD spectroscopy. Fibrillar aggregates were prepared by incubating the protein, either unmodified or modified, for 600 min under constant agitation. As observed in Fig. 3.5A, incubation of unmodified Wil under constant agitation led to a far-UV spectrum displaying a single minimum at 225 nm and a high-intensity maximum at 200 nm. This spectrum is characteristic of the cross- $\beta$ -sheet structure of amyloid fibrils [47]. Similarly, Wil aggregation induced drastic modifications of the near-UV spectrum with the signal intensity increase between 250 and 295 nm (Fig. 5B). As Wil LC encompasses four Phe, five Tyr and one Trp, these changes revealed that the environment of some or all of these residues was reorganized during the process of amyloid formation. Thus, Wil self-assembly into ThT-positive species is associated with major secondary and tertiary structural transition (Fig. 3.3 vs. Fig. 3.5).

Interestingly, the far-UV CD spectrum for HNE-Wil with one modification (treated at 4°C) was very similar to the one for HNE-Wil with several modifications (treated at room temperature). However, both differed drastically with the spectrum displayed



for native Wil (Fig. 3.5A). Unlike native Wil, the incubation of HNE-treated Wil samples under constant agitation did not give rise to a far-UV spectrum which is characteristic of the cross- $\beta$ -sheet structure of amyloid fibrils. On the contrary, far-UV spectra for both HNE-treated Wil samples have relatively featureless profiles which seem to indicate the presence of much less structurally ordered species (Fig. 3.5A). This observation suggests that HNE adducts led predominantly to the formation of amorphous aggregates and could explain why HNE-treated samples assemble into aggregates with reduced ThT-binding capacity. Wil samples with one HNE adduct and Wil samples with multiple HNE adducts displayed near-UV CD spectra which are very similar to each other but that differ with the near-UV CD spectrum obtained for native Wil (Fig. 3.5B). The aggregation of HNE-treated Wil samples induced significant modifications of their near-UV spectra, with a notable increase in the signal intensity between 255 and 290 nm (Fig. 3.5B *vs.* Fig. 3.3B) which indicates a reorganization of the environment of aromatic residues typical of aggregation. However, it appears that this aggregation process is driven by structural changes that are different than those observed for native Wil. This is compatible with the hypothesis that Wil samples treated with HNE assemble into unstructured amorphous aggregates. Far-UV CD spectra of nitrated Wil revealed that the protein displayed a random coil rich secondary structure upon agitation, as indicated with the minima at 206 and 215 (Fig. 5A). Near-UV CD spectrum of n-Wil is quite unusual and difficult to interpret due to the incorporation of the nitro group on the Tyr side chain, which affects significantly the absorbance spectrum and optical activity of the protein between 260 and 290 nm. Far-UV and near-UV spectra for o-Wil are very similar to those obtained for native Wil (Fig. 5A. and Fig. 5B.). This suggests that oxidation of Met<sup>1</sup> had very little effect on the structure and morphology of the fibrillar aggregates. This is consistent with the fact that oxidation of Met<sup>1</sup> does not appear to alter the native structure of the protein (Fig. 3.3A and Fig. 3.3B) and that it does not affect the kinetics of amyloid formation (Table 3.2).



### 3.6 Conclusions

Most of the research works on light chain amyloidosis has focused so far on the contributions of the primary structure and the stability on the amyloidogenicity of LCs. The link between the low thermodynamic stability of a LC variable domain and its propensity to self-assemble into amyloid fibrils has been the subject of multiple reports [13-17]. The specific mutations responsible for this decreased stability have also been thoroughly investigated [13, 14, 17-19]. However, while the roles of non-enzymatic PTMs have garnered a lot of attention in the field of neurodegenerative amyloidoses [48-51], very little is known about their impact on the stability and amyloidogenicity of LCs. Considering the lack of available knowledge on this subject, we addressed the role of three PTMs on Wil, an LC from the  $\lambda 6$  germline. These PTMs are carbonylation, oxidation and nitration respectively achieved by treatment with HNE, hydrogen peroxide and TNM. Our results showed that globally, treatments with HNE,  $H_2O_2$  and TNM led to strong modifications of Wil, with very little protein left unmodified, in all cases. HNE treatment at 4°C generated protein with only one HNE adduct on residue His<sup>54</sup>, while treatment performed at room temperature generated HNE adducts on up to all four His residues with His<sup>54</sup> being the most intensely modified. Nitration by treatment with TNM generated Wil samples with up to four modified tyrosines and with one tyrosine always left unmodified, Tyr<sup>90</sup>. In Wil samples treated with  $H_2O_2$ , non-native Met<sup>1</sup> was always oxidized while both Cys residues were protected from oxidation by the disulfide bridge.

Next, we investigated the impact of these PTMs on the kinetics of amyloid formation of  $\lambda 6$  V<sub>L</sub> Wil by using the thioflavin T assay. Wil protein with one HNE adduct (treated at 4°C) displayed significantly slower kinetics of aggregation than native Wil and led to aggregates with reduced ThT-binding capacity. In contrast, Wil species with several HNE adducts (treatment at room temperature) displayed faster aggregation kinetics, but once again aggregates showed much lower ThT-binding

capacity. Similarly, nitrated Wil species exhibited a shorter lag phase and a lower maximum intensity of the ThT signal in comparison with unmodified Wil.

Two main factors can influence the amyloidogenicity of a protein, namely a change in its stability and/or specific variations in its structural properties. In order to better understand how these PTMs affect the amyloidogenicity of Wil, we investigated their influence on the thermal stability of the protein and used CD spectroscopy to probe their effect on the structures of native Wil and of the fibrillar aggregates. CD spectroscopy analysis revealed that HNE treatments (4°C and room temperature) did not alter the secondary nor the tertiary structure of Wil significantly, although they reduced signal intensity in both far-UV and near-UV. In contrast, the far-UV CD spectra of aggregates formed by HNE-treated Wil samples drastically differed with those of aggregates formed by native Wil. These spectra suggest that HNE adducts lead predominantly to the formation of amorphous aggregates, which could explain why these aggregates displayed weaker ThT-binding capacity. The presence of HNE-adducts could alter the structural changes that drive the aggregation process and could explain the differences in the kinetics of fibrillation between HNE-treated Wil samples and native Wil. Thermal denaturation studies indicated that HNE conjugation did not affect the thermal stability of Wil. This suggests that variations in stability are probably not causing the differences in amyloidogenicity in this case. Far-UV CD spectra showed that nitration of Wil increased the proportion of random coil conformation within the protein. Thermal denaturation studies revealed that nitration significantly reduced the thermal stability of Wil. These results suggest that both secondary structure variations and decreased stability could be implicated in the increased amyloidogenicity of n-Wil.

Overall, this study reinforces once again the notion that two factors must be considered when evaluating the amyloidogenicity of a light chain variable domain in AL, namely the thermodynamic stability of the V<sub>L</sub>, but also structural variations that

can alter its propensity for intermolecular interactions and aggregation. Our results suggest that although  $\lambda 6$  V<sub>L</sub> Wil can readily undergo intense post-translational modifications *in vitro*, these PTMs only moderately affect the amyloidogenicity of Wil. In this regard, V<sub>L</sub> Wil appears to be resilient to the three PTMs evaluated in the present study.

**Acknowledgements**

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (418614). M.L.W. is a recipient of a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada - Graham Bell scholarship.

**Author contribution**

M.L.W., J.K-B., M.G. and L.O. performed the experimental work. M.L.W. designed the experiments, analyzed the data and wrote the initial version of the paper. S.B. and L.S. supervised the research. S.B. revised the paper.



### 3.7 References

- [1] A. Solomon, Light chains of human immunoglobulins, *Methods Enzymol*, 116 (1985) 101-121.
- [2] M. Ramirez-Alvarado, J. De Stigter, E. Baden, L. Sikkink, R. McLaughlin, A. Taboas, Immunoglobulin Light Chain and Systemic Light-Chain Amyloidosis, in: V. Uversky, A. Fink (Eds.) *Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases*, vol. 6, Springer US, 2007, pp. 183-197.
- [3] A. Solomon, D.T. Weiss, Protein and host factors implicated in the pathogenesis of light chain amyloidosis (AL amyloidosis), *Amyloid*, 2 (1995) 269-279.
- [4] J. Buxbaum, Mechanisms of disease: monoclonal immunoglobulin deposition. Amyloidosis, light chain deposition disease, and light and heavy chain deposition disease, *Hematol Oncol Clin North Am*, 6 (1992) 323-346.
- [5] K.E. Olsen, K. Sletten, P. Westermark, Extended analysis of AL-amyloid protein from abdominal wall subcutaneous fat biopsy: kappa IV immunoglobulin light chain, *Biochem Biophys Res Commun*, 245 (1998) 713-716.
- [6] E.M. Baden, L.A. Sikkink, M. Ramirez-Alvarado, Light chain amyloidosis - current findings and future prospects, *Curr Protein Pept Sci*, 10 (2009) 500-508.
- [7] A. Solomon, B. Frangione, E.C. Franklin, Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. Preferential association of the V lambda VI subgroup of human light chains with amyloidosis AL (lambda), *J Clin Invest*, 70 (1982) 453-460.
- [8] S. Ozaki, M. Abe, D. Wolfenbarger, D.T. Weiss, A. Solomon, Preferential expression of human lambda-light-chain variable-region subgroups in multiple myeloma, AL amyloidosis, and Waldenstrom's macroglobulinemia, *Clin Immunol Immunopathol*, 71 (1994) 183-189.
- [9] R.L. Comenzo, Y. Zhang, C. Martinez, K. Osman, G.A. Herrera, The tropism of organ involvement in primary systemic amyloidosis: contributions of Ig V(L) germ line gene use and clonal plasma cell burden, *Blood*, 98 (2001) 714-720.
- [10] V. Perfetti, S. Casarini, G. Palladini, M.C. Vignarelli, C. Klersy, M. Diegoli, E. Ascari, G. Merlini, Analysis of V(lambda)-J(lambda) expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies 3r (lambdaIII) as a new amyloid-associated germline gene segment, *Blood*, 100 (2002) 948-953.
- [11] R.S. Abraham, S.M. Geyer, T.L. Price-Troska, C. Allmer, R.A. Kyle, M.A. Gertz, R. Fonseca, Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain-associated amyloidosis (AL), *Blood*, 101 (2003) 3801-3808.
- [12] L.Y. Ch'ang, C.P. Yen, L. Besl, M. Schell, A. Solomon, Identification and characterization of a functional human Ig V lambda VI germline gene, *Mol Immunol*, 31 (1994) 531-536.
- [13] J. Wall, M. Schell, C. Murphy, R. Hrnacik, F.J. Stevens, A. Solomon, Thermodynamic instability of human lambda 6 light chains: correlation with fibrillogenicity, *Biochemistry*, 38 (1999) 14101-14108.

- [14] M.R. Hurle, L.R. Helms, L. Li, W. Chan, R. Wetzel, A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (1994) 5446-5450.
- [15] Y. Kim, J.S. Wall, J. Meyer, C. Murphy, T.W. Randolph, M.C. Manning, A. Solomon, J.F. Carpenter, Thermodynamic modulation of light chain amyloid fibril formation, *J Biol Chem*, 275 (2000) 1570-1574.
- [16] C. Dealwis, J. Wall, Towards understanding the structure-function relationship of human amyloid disease, *Curr Drug Targets*, 5 (2004) 159-171.
- [17] J.S. Wall, V. Gupta, M. Wilkerson, M. Schell, R. Loris, P. Adams, A. Solomon, F. Stevens, C. Dealwis, Structural basis of light chain amyloidogenicity: comparison of the thermodynamic properties, fibrillogenic potential and tertiary structural features of four V $\lambda$ 6 proteins, *J Mol Recognit*, 17 (2004) 323-331.
- [18] M. Ramirez-Alvarado, J.S. Merkel, L. Regan, A systematic exploration of the influence of the protein stability on amyloid fibril formation in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (2000) 8979-8984.
- [19] E.M. Baden, E.G. Randles, A.K. Aboagye, J.R. Thompson, M. Ramirez-Alvarado, Structural insights into the role of mutations in amyloidogenesis, *J Biol Chem*, 283 (2008) 30950-30956.
- [20] H.Y. Kim, V.N. Gladyshev, Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases, *Mol Biol Cell*, 15 (2004) 1055-1064.
- [21] R. Radi, Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (2004) 4003-4008.
- [22] L.M. Sayre, D. Lin, Q. Yuan, X. Zhu, X. Tang, Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one, *Drug Metab Rev*, 38 (2006) 651-675.
- [23] E. Shacter, Quantification and significance of protein oxidation in biological samples, *Drug Metab Rev*, 32 (2000) 307-326.
- [24] I.V. Murray, L. Liu, H. Komatsu, K. Uryu, G. Xiao, J.A. Lawson, P.H. Axelsen, Membrane-mediated amyloidogenesis and the promotion of oxidative lipid damage by amyloid beta proteins, *J. Biol. Chem.*, 282 (2007) 9335-9345.
- [25] D.A. Bosco, D.M. Fowler, Q. Zhang, J. Nieva, E.T. Powers, P. Wentworth, Jr., R.A. Lerner, J.W. Kelly, Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrilization, *Nat Chem Biol*, 2 (2006) 249-253.
- [26] E.R. Stadtman, R.L. Levine, Protein oxidation, *Ann N Y Acad Sci*, 899 (2000) 191-208.
- [27] J. Nieva, A. Shafton, L.J. Altobelli, 3rd, S. Tripuraneni, J.K. Rogel, A.D. Wentworth, R.A. Lerner, P. Wentworth, Jr., Lipid-derived aldehydes accelerate light chain amyloid and amorphous aggregation, *Biochemistry*, 47 (2008) 7695-7705.
- [28] D. Hu, Z. Qin, B. Xue, A.L. Fink, V.N. Uversky, Effect of methionine oxidation on the structural properties, conformational stability, and aggregation of immunoglobulin light chain LEN, *Biochemistry*, 47 (2008) 8665-8677.

- [29] T. Mishima, T. Ohkuri, A. Monji, T. Kanemaru, Y. Abe, T. Ueda, Residual structures in the acid-unfolded states of V $\lambda$ 6 proteins affect amyloid fibrillation, *J Mol Biol*, 392 (2009) 1033-1043.
- [30] B.A. Bruenner, A.D. Jones, J.B. German, Direct characterization of protein adducts of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal using electrospray mass spectrometry, *Chem Res Toxicol*, 8 (1995) 552-559.
- [31] K. Uchida, E.R. Stadtman, Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (1992) 4544-4548.
- [32] N. Hattoria, M. Wanga, H. Taka, T. Fujimura, A. Yoritaka, S. Kubo, H. Mochizuki, Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat Disord*, 15 Suppl 1 (2009) S35-38.
- [33] A. Trostchansky, S. Lind, R. Hodara, T. Oe, I.A. Blair, H. Ischiropoulos, H. Rubbo, J.M. Souza, Interaction with phospholipids modulates alpha-synuclein nitration and lipid-protein adduct formation, *Biochem J*, 393 (2006) 343-349.
- [34] P.R. Pokkuluri, A. Solomon, D.T. Weiss, F.J. Stevens, M. Schiffer, Tertiary structure of human lambda 6 light chains, *Amyloid*, 6 (1999) 165-171.
- [35] J.M. Souza, E. Daikhin, M. Yudkoff, C.S. Raman, H. Ischiropoulos, Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration, *Arch Biochem Biophys*, 371 (1999) 169-178.
- [36] W. Vogt, Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal, *Free Radic Biol Med*, 18 (1995) 93-105.
- [37] L. Liu, H. Komatsu, I.V. Murray, P.H. Axelsen, Promotion of amyloid beta protein misfolding and fibrillogenesis by a lipid oxidation product, *J Mol Biol*, 377 (2008) 1236-1250.
- [38] Z. Qin, D. Hu, S. Han, S.H. Reaney, D.A. Di Monte, A.L. Fink, Effect of 4-hydroxy-2-nonenal modification on alpha-synuclein aggregation, *J Biol Chem*, 282 (2007) 5862-5870.
- [39] M.J. Hokenson, V.N. Uversky, J. Goers, G. Yamin, L.A. Munishkina, A.L. Fink, Role of individual methionines in the fibrillation of methionine-oxidized alpha-synuclein, *Biochemistry*, 43 (2004) 4621-4633.
- [40] B.I. Giasson, J.E. Duda, I.V. Murray, Q. Chen, J.M. Souza, H.I. Hurtig, H. Ischiropoulos, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions, *Science*, 290 (2000) 985-989.
- [41] T. Horiguchi, K. Uryu, B.I. Giasson, H. Ischiropoulos, R. LightFoot, C. Bellmann, C. Richter-Landsberg, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies, *Am J Pathol*, 163 (2003) 1021-1031.
- [42] E.H. Norris, B.I. Giasson, H. Ischiropoulos, V.M. Lee, Effects of oxidative and nitrative challenges on alpha-synuclein fibrillogenesis involve distinct mechanisms of protein modifications, *J Biol Chem*, 278 (2003) 27230-27240.
- [43] H. LeVine, 3rd, Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T, *Methods Enzymol*, 309 (1999) 274-284.



- [44] V. De Filippis, R. Frasson, A. Fontana, 3-Nitrotyrosine as a spectroscopic probe for investigating protein protein interactions, *Prot. Sci.*, 15 (2006) 976-986.
- [45] D.B. Huang, C.H. Chang, C. Ainsworth, G. Johnson, A. Solomon, F.J. Stevens, M. Schiffer, Variable domain structure of kappaIV human light chain Len: high homology to the murine light chain McPC603, *Mol. Immunol.*, 34 (1997) 1291-1301.
- [46] E.M. Baden, B.A. Owen, F.C. Peterson, B.F. Volkman, M. Ramirez-Alvarado, J.R. Thompson, Altered dimer interface decreases stability in an amyloidogenic protein, *J Biol Chem*, 283 (2008) 15853-15860.
- [47] H.A. Lashuel, S.R. Labrenz, L. Woo, L.C. Serpell, J.W. Kelly, Protofilaments, filaments, ribbons, and fibrils from peptidomimetic self-assembly: implications for amyloid fibril formation and materials science, *J Am Chem Soc*, 122 (2000) 5262-5277.
- [48] L. Zhao, J.N. Buxbaum, N. Reixach, Age-related oxidative modifications of transthyretin modulate its amyloidogenicity, *Biochemistry*, 52 (2013) 1913-1926.
- [49] I.M. Qahwash, A. Boire, J. Lanning, T. Krausz, P. Pytel, S.C. Meredith, Site-specific effects of peptide lipidation on beta-amyloid aggregation and cytotoxicity, *J Biol Chem*, 282 (2007) 36987-36997.
- [50] T. Nasstrom, T. Fagerqvist, M. Barbu, M. Karlsson, F. Nikolajeff, A. Kasrayan, M. Ekberg, L. Lannfelt, M. Ingelsson, J. Bergstrom, The lipid peroxidation products 4-oxo-2-nonenal and 4-hydroxy-2-nonenal promote the formation of alpha-synuclein oligomers with distinct biochemical, morphological, and functional properties, *Free Radic Biol Med*, 50 (2011) 428-437.
- [51] W. Xiang, J.C. Schlachetzki, S. Helling, J.C. Bussmann, M. Berlinghof, T.E. Schaffer, K. Marcus, J. Winkler, J. Klucken, C.M. Becker, Oxidative stress-induced posttranslational modifications of alpha-synuclein: specific modification of alpha-synuclein by 4-hydroxy-2-nonenal increases dopaminergic toxicity, *Mol Cell Neurosci*, 54 (2013) 71-83.



### 3.8 Tables

**Table 3.1** Verification of modified amino acid residues of Wil by LC/MS/MS

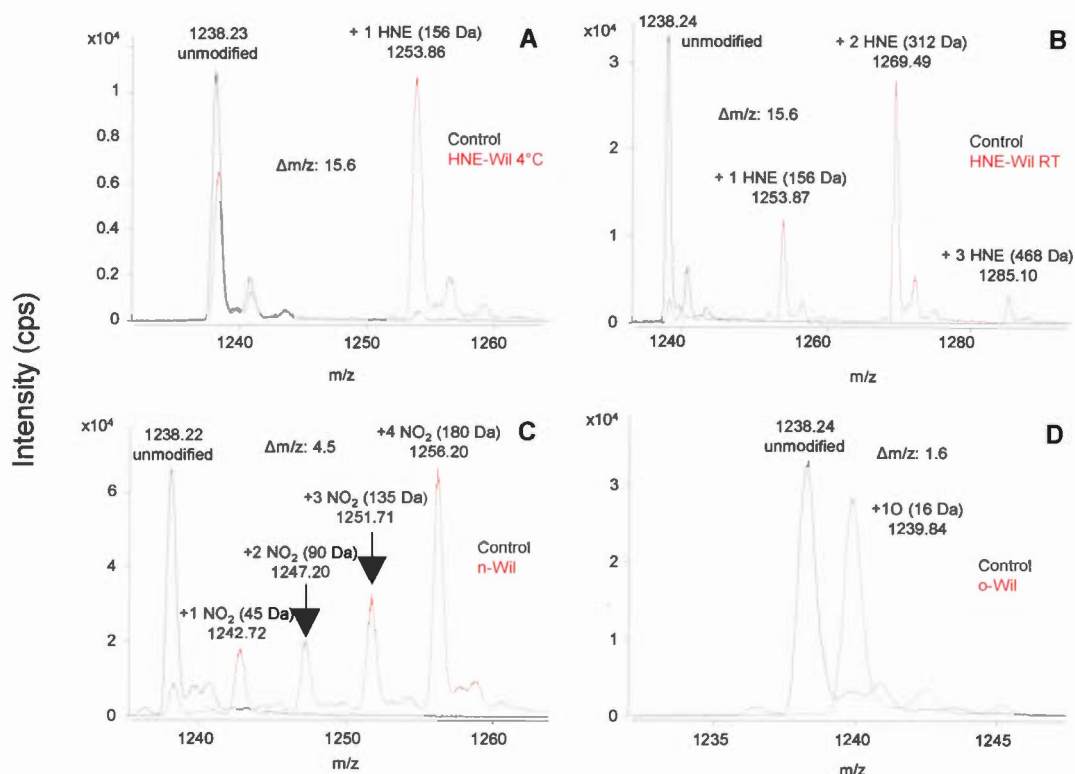
Modification	Candidate residues	HNE (4°C)	HNE (RT)	Oxydation	Nitration
HNE adduct	H8	—	+	—	—
	H35	—	+	—	—
	H54	+	+	—	—
	H96	—	+	—	—
Oxidation	M1	—	—	+	—
	C23	—	—	—	—
	C88	—	—	—	—
Nitration	Y33	—	—	—	+
	Y37	—	—	—	+
	Y89	—	—	—	+
	Y90	—	—	—	—
	Y94	—	—	—	+

Native Wil, HNE-Wil (4°C and RT), o-Wil and n-Wil were digested with trypsin. HNE-modification, oxidation and nitration of residues of Wil were verified. + The residue is modified; — The residue is not modified.

**Table 3.2** Kinetic parameters of amyloid formation

Modification	Lag time (min)	T <sub>50</sub> (min)	Maximum intensity (a.u.)
Unmodified	187 ± 22	216 ± 12	438 ± 27
HNE (4°C)	377 ± 34	387 ± 29	305 ± 39
HNE (RT)	108 ± 24	122 ± 17	218 ± 11
Nitration	141 ± 15	157 ± 11	224 ± 17
Oxidation	203 ± 9	229 ± 12	441 ± 18

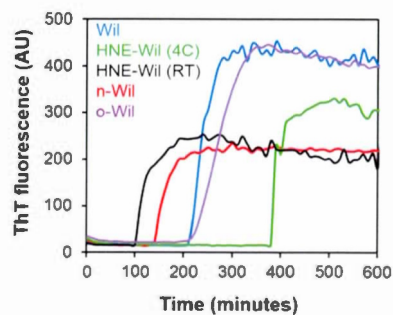
### 3.9 Figures



**Figure 3.1** Verification of HNE-modification, nitration and oxidation of Wil induced by HNE, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tetranitromethane by LC-TOF-MS

Only +10 ions are shown. (A) Unmodified Wil protein (control, observed monoisotopic m/z: 1238.23) and its modified form (observed monoisotopic m/z: 1253.86; mass increase: 156 Da) in Wil treated with 2.4 mM HNE for 18 hours at 4°C. (B) Unmodified Wil protein (Control, observed monoisotopic m/z: 1238.24) and its three modified forms (m/z: 1253.87, 1269.49 and 1285.10; respective mass increase: 156, 312 and 468 Da) in Wil treated with 2.4 mM HNE for 18 hours at room temperature. (C) Unmodified Wil protein (Control, observed monoisotopic m/z: 1238.22) and its four modified forms (m/z: 1242.72, 1247.20, 1251.71 and 1256.20; respective mass increase: 45, 90, 135 and 180 Da) in Wil treated with 20 mM TNM for 4 hours at room temperature. (D) Unmodified Wil protein (control, observed

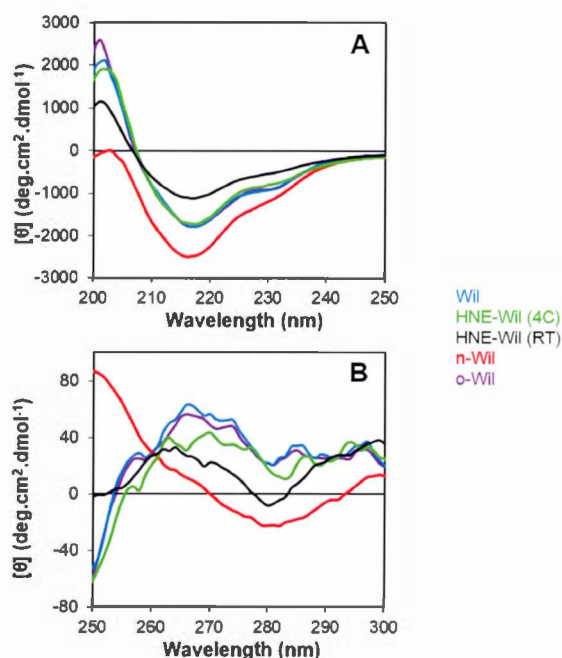
monoisotopic  $m/z$ : 1238.24) and its modified form (observed monoisotopic  $m/z$ : 1239.84; mass increase: 16 Da) in Wil treated with 3%  $H_2O_2$  for 1 hour at room temperature.



**Figure 3.2** Effect of post-translational modifications on the kinetics of Wil amyloid formation

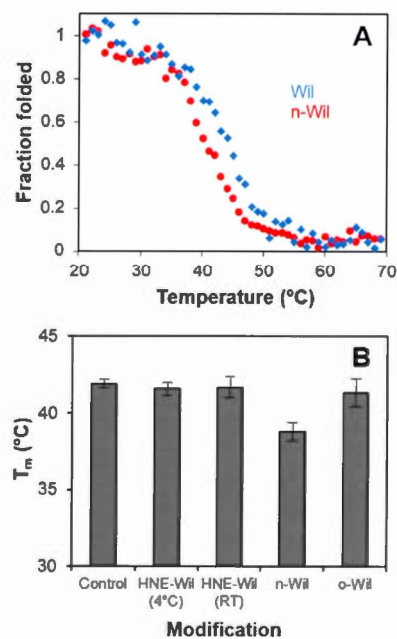
Representative kinetics of fibrillation of Wil (blue), HNE-Wil treated at 4°C (green), HNE-Wil treated at room temperature (black), n-Wil (red) and o-Wil (purple), monitored by ThT fluorescence induced by incubation under constant agitation at 37°C in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl. Protein concentration: 0.1 mg/ml.





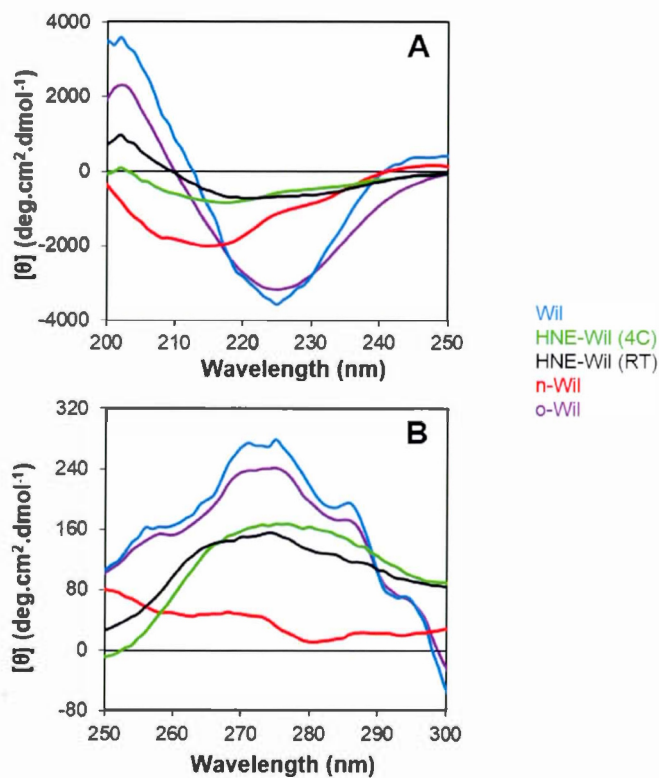
**Figure 3.3** Effect of post-translational modifications on the secondary and tertiary structures of native Wil

Far-UV (A) and Near-UV (B) circular dichroism spectra of Wil (blue), HNE-Wil treated at 4°C (green), HNE-Wil treated at room temperature (black), n-Wil (red) and o-Wil (purple). Protein concentration: 0.2 mg/ml in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl.



**Figure 3.4** Effect of post-translational modifications on the thermal stability of native Wil

(A) Thermal denaturation monitored by the mean residue ellipticity at 218 nm of native Wil (red) and of n-Wil (blue) in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl. (B) Comparison of the melting temperatures ( $T_m$ ) of native and modified Wil species.



**Figure 3.5** Effect of post-translational modifications on the structural properties of the resulting fibrils of Wil

Far-UV (A) and Near-UV (B) circular dichroism spectra of Wil (blue), HNE-Wil treated at 4°C (green), HNE-Wil treated at room temperature (black), n-Wil (red) and o-Wil (purple) after 600 min incubation under constant agitation at 37°C. Protein concentration: 0.2 mg/ml in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

L'amyloïdose à chaînes légères (AL) est causée par le dépôt systémique de chaînes légères d'anticorps (LCs) à la suite de leur hypersécrétion par un clone de lymphocyte B anormalement prolifératif. Chez les patients atteints par la maladie, des LCs libres sont sécrétées dans la circulation sanguine, subissent un mauvais repliement et s'assemblent en fibres amyloïdes. Les LCs s'accumulent dans l'espace extracellulaire d'organes vitaux tels les reins, le coeur et le foie entraînant leur détérioration, et éventuellement la mort (Solomon, 1985; Solomon et Weiss, 1995; Ramirez-Alvarado et al., 2007). L'approche thérapeutique qui est couramment privilégiée consiste à limiter le risque de dépôts amyloïdes au niveau des organes qui ne sont pas encore atteints et de limiter la dégradation des organes déjà touchés. Dans cette optique, le traitement contre l'AL vise principalement à éliminer le clone de lymphocytes B responsable de l'accumulation des fibres amyloïdes. L'approche la plus efficace consiste en une chimiothérapie à fortes doses couplée à une greffe de cellules souches. Malheureusement, différents critères d'exclusion font que seuls 20% des patients atteints d'AL sont éligibles à la greffe de cellules souches (Gertz, 2014). Les patients qui n'y sont pas admissibles peuvent tout de même recevoir certains traitements de chimiothérapie par voie orale (Gertz, 2014). Malgré l'existence de ces traitements, le pronostic est généralement précaire pour les patients atteints d'AL. D'ailleurs, la médiane de survie est d'environ 3 ans après le diagnostic (Hemminki et



al., 2012). Dans ce contexte, le développement d'approches thérapeutiques alternatives ou concomitantes est un objectif primordial.

Historiquement, la communauté scientifique a supposé que l'accumulation des fibres amyloïdes était la principale cause de la dégénérescence tissulaire et de la progression de la maladie dans le cadre des amyloïdoses. Toutefois, des études récentes portant sur des protéines amyloïdogéniques dont l' $\alpha$ -synucléine, la transthyrétine et le peptide A $\beta$  ont montré que certaines espèces oligomériques et préfibrillaires induisent la mort cellulaire tandis que les fibres amyloïdes matures ne sont en général que faiblement cytotoxiques (Kayed et al., 2003). Ces études ont montré que la cytotoxicité médiée par les oligomères est un élément important dans les amyloïdoses neurodégénératives, mais il n'est pas aussi clair que le même mécanisme est central dans la pathogenèse des amyloïdoses non neurodégénératives. En effet, les amyloïdoses systémiques non neurodégénératives (dont l'AL) sont souvent associées à l'accumulation de très grandes quantités, parfois même des kilos, de dépôts amyloïdes dans les tissus et organes affectés (Pepys, 2001). De toute évidence, la présence de ces dépôts au niveau d'organes vitaux perturbe l'architecture des tissus et il est probable qu'elle soit le facteur principal de la pathogenèse (Pepys, 2001). Cependant, il a quand même été suggéré que les espèces oligomériques pourraient avoir un rôle important dans le cadre de ces amyloïdoses systémiques (Sousa et al., 2001; Merlini et Bellotti, 2003). Il semble donc que le développement d'une approche thérapeutique doit se baser sur une caractérisation des intermédiaires toxiques de la cascade amyloïdogénique ainsi que sur une meilleure connaissance du lien entre les espèces on- et off-pathway. Plus spécifiquement, la stabilisation d'une conformation non toxique et/ou non amyloïdogénique est dorénavant considérée comme une des approches thérapeutiques les plus efficaces. C'est ce type de stratégie qui a permis le développement du *Tafamidis*, premier médicament approuvé pour le traitement des amyloïdoses liées à la transthyrétine (TTR) (Johnson et al., 2012). Cette petite molécule agit en stabilisant la forme tétramérique de la TTR, ce qui empêche sa dissociation en la forme

amyloïdogénique de la protéine, le monomère, inhibant ainsi la formation de fibres amyloïdes (Bulawa et al., 2012).

C'est donc avec l'objectif d'identifier une conformation non toxique et/ou non amyloïdogénique que nous nous sommes intéressés aux différentes espèces de la voie de formation de fibres amyloïdes ainsi qu'aux mécanismes d'auto-assemblage des chaînes légères de l'AL. Puisqu'il a été rapporté que l'homodimérisation ainsi que la stabilité des LCs pourraient jouer un rôle important dans leur amyloïdogénicité et leur toxicité, nous avons concentré notre attention sur l'équilibre monomère-dimère de deux  $V_L$  de la lignée  $\lambda 6$ , Wil et Jto. Au cours de cette étude (présentée au chapitre 2) nous avons remarqué que sous des conditions de faible force ionique, une augmentation de la concentration en  $V_L$  Wil se traduisait en une augmentation de la durée de la phase de latence menant à la formation de fibres amyloïdes. Ceci est en opposition avec ce qui est normalement attendu d'un processus de polymérisation dépendant d'une nucléation (comme celui de l'amyloïdogénèse) dans lequel la vitesse d'auto-assemblage devrait être directement proportionnelle à la concentration en protéine. Cette observation semblait révéler l'existence d'espèces off-pathway dont la formation est sensible à l'augmentation de la concentration. Par SEC-analytique, DLS et spectroscopie CD UV-proche, nous avons observé qu'à faible force ionique, le  $V_L$  amyloïdogénique  $\lambda 6$  Wil ainsi que le  $V_L$  non amyloïdogénique  $\lambda 6$  Jto s'assemblent en dimères de façon dépendante de la concentration, comme il a été rapporté pour plusieurs autres domaines variables (Stevens et al., 1980; Kolmar et al., 1994; Souillac et al., 2002; Qin et al., 2007; Baden et al., 2008). Les constantes de dissociation que nous avons déterminé pour ces dimérisations sont de  $56 \pm 9 \mu\text{M}$  et  $49 \pm 3 \mu\text{M}$  pour Wil et Jto respectivement, des valeurs qui concordent avec celles rapportées pour d'autres  $V_L$ , avec des constantes de dissociation variant entre 3 et 217  $\mu\text{M}$  (Stevens et al., 1980; Souillac et al., 2002; del Pozo-Yauner et al., 2014). Il s'est avéré que cette affinité des dimères est considérablement diminuée à force ionique élevée. Effectivement, nos résultats ont montré que les deux  $V_L$   $\lambda 6$  sont encore

principalement sous leur forme monomérique à une concentration de 2.0 mg/ml en présence de 150 mM NaCl. Dans nos essais, cette réduction de l'affinité du dimère à force ionique élevée s'est traduite par une vitesse de formation de fibres amyloïdes directement proportionnelle à la concentration en protéine. Ces résultats indiquent que le monomère est essentiel à la fibrillation tandis que la dimérisation l'inhibe. Ceci concorde avec ce qui a déjà été rapporté pour les LCs SMA et LEN de la lignée  $\kappa$ IV (Souillac et al., 2002; Souillac et al., 2002; Qin et al., 2007). De plus, ces résultats montrent que l'interface du dimère des  $V_L \lambda 6$  est sensible à la présence de NaCl. Ceci semble indiquer que certaines interactions électrostatiques au niveau de l'interface sont essentielles à la stabilité du dimère.

Il est généralement accepté que l'initiation de la fibrillation se fait par le biais d'un dépliement partiel (ou d'un mauvais repliement) pour des protéines nativement repliées comme les  $V_L$ . Pour cette raison, nous avons initialement présumé que l'inhibition de la fibrillation induite par la dimérisation découlait d'une plus grande stabilité de la forme dimérique, comme c'est le cas pour la LC SMA (Qin et al., 2007) et pour la protéine homotétramérique TTR (Jiang et al., 2001). Toutefois, nos études de dénaturation thermique et chimique ont révélé que les dimères de  $V_L \lambda 6$  ont une stabilité équivalente à celle du monomère. Il semble donc que la protection contre la fibrillation qui est procurée par la dimérisation n'est pas due à une plus grande stabilité thermodynamique, mais probablement à certaines caractéristiques structurales. Il a été démontré que la stabilité thermodynamique des mutants (de Jto) JtoD29a et JtoR68 est la même que celle de la protéine sauvage. Toutefois, la fibrillation est beaucoup plus rapide à partir de JtoR68 qu'à partir de la protéine non mutée (Wall et al., 2004). Plusieurs différences ont été mises en évidence entre les chaînes latérales de JtoR68 et celles de Jto et JtoD29a. Ces différences ont pour effet de changer le potentiel électrostatique de surface et d'augmenter la surface hydrophobe exposée au solvant chez JtoR68, favorisant son amyloïdogénicité (Wall et al., 2004). Il est reconnu que les mutations et/ou les changements structuraux qui

augmentent la surface hydrophobe et/ou la charge négative nette d'une protéine favorisent son amyloïdogénicité. Comme plusieurs résidus hydrophobes sont situés à l'interface du dimère de Wil (Pokkuluri et al., 1999), la dimérisation peut grandement modifier l'exposition au solvant des domaines hydrophobes favorables aux interactions intermoléculaires et à l'agrégation, et donc inhiber la formation de fibres amyloïdes.

L'étude présentée au chapitre 2 a renforcé la notion que la stabilité thermodynamique des  $V_L$  n'est pas le seul déterminant de l'amyloïdogénicité et que certaines modifications tertiaires/quaternaires peuvent également affecter la propension des LCs à s'assembler en fibres amyloïdes. De plus, nos résultats ont révélé que la dimérisation des LCs  $\lambda 6$  mène à la formation d'espèces off-pathway et inhibe ainsi la formation de fibres amyloïdes. La conception d'un médicament visant à déplacer l'équilibre monomère-dimère vers le dimère pourrait inhiber l'auto-assemblage des LCs en fibres amyloïdes et ainsi ralentir la progression de l'AL.

Il a été rapporté que la prolifération lymphocytaire associée au myélome multiple et à l'AL est liée à une surexpression de gènes impliqués dans la hausse des niveaux de stress oxydatif (Mahajan et al., 2015). Tout au long de leur vie biologique, les protéines peuvent accumuler diverses modifications post-traductionnelles (PTMs) non-enzymatiques qui sont causées majoritairement par le stress oxydatif et sont responsables du vieillissement moléculaire des protéines. La présence de modifications post-traductionnelles non enzymatiques liées au stress oxydatif a été mise en évidence dans des dépôts amyloïdes provenant de patients souffrant d'AL (Ando et al., 1997). Il a été suggéré que ces PTMs peuvent avoir un impact sur les propriétés physico-chimiques, la structure et l'amyloïdogénicité des LCs de l'AL (Baden et al., 2009). Alors que l'impact de ces PTMs sur l'amyloïdogénicité est un sujet qui a reçu beaucoup d'attention dans le cadre des amyloïdoses neurodégénératives (Qahwash et al., 2007; Nasstrom et al., 2011; Xiang et al., 2013;



Zhao et al., 2013), il existe très peu d'information sur leur rôle dans l'AL. Récemment, deux études se sont intéressées à l'impact des PTMs sur l'amyloïdogénicité des LCs. La première a rapporté que l'agrégation des LCs  $\kappa$ -( $\kappa$ -MJM) et  $\lambda$ -( $\lambda$ -L155) peut être accélérée *in vitro* lorsqu'elles sont incubées en présence d'aldéhydes dérivés de lipides comme le 4-hydroxynonéal (HNE) (Nieva et al., 2008). L'autre étude s'est intéressée à l'impact de l'oxydation de la méthionine sur la LC LEN, une protéine du myélome multiple, et a montré que cette modification peut engendrer d'importants changements structuraux ainsi qu'une déstabilisation de LEN. La forme modifiée de LEN formait des agrégats amorphes dans des conditions où la protéine native s'assemble en fibres amyloïdes (Hu et al., 2008).

Compte tenu du manque de connaissances sur le sujet, et de l'importance de savoir si les observations précédentes peuvent être transposées à d'autres lignées de LCs, nous sommes proposé d'étudier l'impact de PTMs sur le V<sub>L</sub> Wil de la lignée  $\lambda$ 6. Notre étude, présentée au chapitre 3, s'intéresse à des modifications de Wil par trois PTMs, soit la carbonylation par le HNE, l'oxydation et la nitration. Ces modifications ont été induites par des traitements au HNE, au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et au tétranitrométhane (TNM) respectivement. Deux types de traitements au HNE ont été réalisés, soit un à 4°C et l'autre à température pièce. Nos résultats ont montré que globalement, les traitements au HNE, TNM et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont induit d'intenses modifications de la LC Wil. Les principaux résidus susceptibles d'être modifiés par des adduits de HNE sont les cystéines (deux dans la séquence de Wil), les histidines (quatre) et les lysines (trois) (Uchida et Stadtman, 1992). Le traitement au HNE à 4°C a mené à la modification du résidu His<sup>54</sup> exclusivement. Pour sa part, le traitement à température pièce a modifié toutes les histidines avec différentes intensités, His<sup>54</sup> ayant subi la modification la plus intense. Ni les cystéines ni les lysines n'ont été modifiées par les deux types de traitements. Des résultats similaires ont été rapportés pour l' $\alpha$ -synucléine, pour laquelle le résidu His<sup>50</sup> a été identifié comme la cible principale de la modification au HNE (Trostchansky et al., 2006). His<sup>54</sup> semble être

l'acide aminé de Wil avec la plus grande réactivité pour le HNE. Nous croyons que ceci est dû à son accessibilité dans la structure native de la protéine ainsi qu'à l'absence de contraintes stériques dans sa proximité (PD ID : 2CDO, (Pokkuluri et al., 1999)). Cinq résidus de Wil étaient susceptibles de subir une nitration suite au traitement au TNM, soit les cinq tyrosines. Des analyses par MS ont montré que les échantillons de Wil traités au TNM présentaient jusqu'à quatre tyrosines modifiées et que les espèces possédant quatre modifications étaient les plus abondantes. Seule Tyr<sup>90</sup> n'a jamais subi de modification, ce qui peut être expliqué par le fait que Tyr<sup>37</sup> est un voisin direct de Tyr<sup>90</sup> dans le repliement protéique et est plus accessible pour la nitration (PD ID : 2CDO, (Pokkuluri et al., 1999)). Une nitration préalable de Tyr<sup>37</sup> offrirait une protection à Tyr<sup>90</sup>. L'efficacité de la nitration de Wil comparativement à d'autres protéines dont la RNase A peut s'expliquer par l'accessibilité des chaînes latérales concernées ainsi que par la présence de charges négatives à proximité des tyrosines (Souza et al., 1999). Plus spécifiquement, des acides aspartiques sont des voisins directs des résidus Tyr<sup>89</sup> et Tyr<sup>94</sup>. Trois résidus de Wil sont susceptibles d'être oxydés par un traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, soit une méthionine non native en position 1 et deux cystéines aux positions 23 et 88. Cependant, Met<sup>1</sup> a été l'unique résidu modifié par ce traitement. Ceci est probablement dû au fait que les deux cystéines sont protégées de l'oxydation en raison de leur implication dans un pont disulfure présent dans la structure native de la protéine.

Nos analyses de l'impact des PTMs sur l'amyloïdogénicité du V<sub>L</sub> Wil ont révélé que la présence d'adduits HNE affecte la cinétique de fibrillation de Wil natif. De plus, les formes de Wil modifiées au HNE ont mené à la formation d'agrégats possédant moins d'affinité à la thioflavine T (ThT). Des analyses de dénaturation thermique ont démontré que l'effet de la carbonylation au HNE sur l'amyloïdogénicité de Wil n'est pas dû à un changement dans sa stabilité. D'autre part, des études par spectroscopie CD ont révélé que les échantillons de Wil traités au HNE engendrent la formation d'agrégats majoritairement amorphes, ce qui justifie leur moindre affinité pour la

ThT. Nous croyons que la présence d'adduits HNE modifie les transitions structurales qui entraînent le processus d'agrégation, ce qui expliquerait les différences entre les cinétiques de fibrillation de HNE-Wil et de la forme native de Wil. Quant à la nitration de Wil, nos résultats ont montré qu'elle a pour effet d'accélérer la cinétique de fibrillation et de réduire la stabilité thermodynamique de Wil. De plus, l'analyse par spectroscopie CD en UV-lointain a révélé que la nitration de Wil a pour effet d'augmenter la proportion de domaine aléatoire dans la structure de la protéine. Ces données semblent indiquer que la nitration des tyrosines de Wil pourrait favoriser son amyloïdogénicité de deux façons, soit par un changement dans certaines des structures secondaires et/ou par une diminution de sa stabilité. En ce qui concerne l'oxydation de Met<sup>1</sup>, elle n'a eu aucun effet sur l'amyloïdogénicité, la stabilité et la structure de Wil. Ceci n'est pas surprenant compte tenu de la position de cet acide aminé au niveau de l'extrémité du segment aléatoire en N-terminal.

Wil a aisément subi d'intenses modifications suite aux traitements au HNE, au TNM et au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, probablement en raison de l'accessibilité au solvant des chaînes latérales des acides aminés concernés. Cependant, nos résultats suggèrent que les PTMs induites n'affectent que modérément son amyloïdogénicité, ce qui porte à croire que Wil est relativement résilient face à ces trois modifications post-traductionnelles. D'autre part, cette étude renforce une notion présentée dans le chapitre 2, soit que dans le contexte de l'AL, la stabilité thermodynamique et les propriétés physico-chimiques et structurales doivent toutes deux être considérées lors de l'évaluation de l'amyloïdogénicité de domaines variables de chaînes légères. La majorité des études récentes portant sur l'AL ont tenté d'identifier des mutations qui peuvent engendrer une diminution de la stabilité des chaînes légères. Nous croyons qu'il est tout aussi important de mettre en lumière les changements structuraux qui exposent certaines régions hydrophobes favorables aux interactions intermoléculaires ou qui altèrent le potentiel électrostatique de surface, deux facteurs qui peuvent favoriser l'amyloïdogénicité des LCs.

## CHAPITRE V

### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La première étude présentée dans ce mémoire porte sur les relations entre la structure quaternaire, la stabilité et l'amyloïdogénicité de domaines variables de chaînes légères de la lignée  $\lambda 6$ , des protéines étroitement liées à la pathologie d'amyloïdose à chaînes légères. Nous y avons observé que la LC amyloïdogénique Wil s'auto-assemble en dimère de façon dépendante de la concentration. Une stabilisation de la forme dimérique de la protéine inhibe le changement de structure associé à l'assemblage de fibres amyloïdes. Des études de dénaturation ont révélé que ces dimères de LC  $\lambda 6$  ont une stabilité équivalente à celle du monomère, ce qui indique que l'effet protecteur du dimère contre la fibrillation n'est pas dû à sa stabilité thermodynamique, mais probablement à certaines caractéristiques structurales défavorables à l'agrégation.

Dans le cadre de notre deuxième étude, nous nous sommes intéressés à l'impact de trois modifications post-traductionnelles non enzymatiques, soit la carbonylation par le HNE, la nitration et l'oxydation, sur l'amyloïdogénicité, la stabilité thermodynamique et la structure de Wil. Nos résultats ont montré que la carbonylation et la nitration de Wil affectent sa propension à former des agrégats et des fibres amyloïdes. La carbonylation a pour effet de modifier les changements structuraux qui entraînent le processus d'agrégation et mène à la formation d'agrégats majoritairement amorphe. Par contre, la nitration engendre la formation d'agrégats fibrillaires et son effet sur l'amyloïdogénicité découle principalement d'une réduction



de la stabilité thermodynamique. L'oxydation de Wil n'a eu aucun effet sur son amyloïdogénicité et sur sa stabilité. Globalement, la protéine Wil s'est montrée résiliente face à ces modifications post-traductionnelles liées au stress oxydatif.

Dans l'ensemble, ces deux études renforcent la notion que dans le contexte de l'AL, la stabilité thermodynamique et les changements structuraux doivent tous deux être considérés lors de l'évaluation de l'amyloïdogénicité de domaines variables de chaînes légères. La majorité des études récentes portant sur l'AL ont tenté d'identifier des mutations qui peuvent engendrer une diminution de la stabilité des chaînes légères. Nous croyons qu'il est tout aussi important de mettre en lumière les changements structuraux qui exposent certaines régions hydrophobes favorables aux interactions intermoléculaires ou qui altèrent le potentiel électrostatique de surface, deux facteurs qui peuvent favoriser l'amyloïdogénicité des LCs.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la dimérisation des chaînes légères de la lignée  $\lambda 6$  freine les réarrangements conformationnels nécessaires à l'assemblage en fibres amyloïdes et ralentit ainsi la fibrillation. Une avenue prometteuse pour ralentir la progression de la pathologie de l'AL serait donc de mettre au point une petite molécule favorisant le dimère dans l'équilibre monomère-dimère, une approche similaire à ce qui a été fait pour le *Tafamidis*® dans le traitement des amyloïdoses liées à la transthyrétine. De plus, compte tenu de l'importance de l'équilibre monomère-dimère, il serait intéressant de faire l'étude de l'impact des modifications post-traductionnelles sur cet équilibre.

Un désavantage de nos essais de formation de fibres amyloïdes sous agitation constante est que cette agitation favorise grandement le processus de nucléation, une étape limitante qui précède l'assemblage rapide des fibres amyloïdes. Ceci fait en sorte que les phases de latence observées *in vitro* sont toutes relativement courtes. Pour cette raison, il est parfois difficile de déterminer clairement si une condition particulière a un effet important ou non sur la cinétique de fibrillation d'une chaîne

légère. Il serait donc intéressant de refaire certains essais sans agitation, ce qui aurait pour effet d'allonger les phases de latence et donc d'accroître les différences de durée entre des phases de latence qui semblent similaires de prime abord. Par exemple, nous souhaiterions réaliser certains essais sans agitation en présence de glycosaminoglycanes, de longs polysaccharides linéaires présents à la surface des cellules et qui sont suspectés d'avoir une influence sur la fibrillation des chaînes légères. Nos résultats préliminaires semblent intéressants, mais la rapidité des cinétiques lors d'essais sous agitation constante les rend difficiles à interpréter avec conviction.

## BIBLIOGRAPHIE

Abedini A, Gupta R, Marek P, Meng F, Raleigh DP, Taskent H et Tracz S. 2010. «Role of Posttranslational Modifications in Amyloid Formation». In Protein Misfolding Diseases. pp 131-144. John Wiley & Sons, Inc.

Abedini A et Raleigh DP. 2009. «A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides». *Protein Eng Des Sel* 22: 453-459.

Abedini A et Raleigh DP. 2009. «A role for helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded polypeptides?». *Phys Biol* 6: 015005.

Abraham RS, Geyer SM, Price-Troska TL, Allmer C, Kyle RA, Gertz MA et Fonseca R. 2003. «Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain-associated amyloidosis (AL)». *Blood* 101: 3801-3808.

Ahmed N, Ahmed U, Thornalley PJ, Hager K, Fleischer G et Munch G. 2005. «Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment». *J Neurochem* 92: 255-263.

Amaral MD. 2004. «CFTR and chaperones: processing and degradation». *J Mol Neurosci* 23: 41-48.

Ando Y, Nyhlin N, Suhr O, Holmgren G, Uchida K, el Sahly M, Yamashita T, Terasaki H, Nakamura M, Uchino M et Ando M. 1997. «Oxidative stress is found in amyloid deposits in systemic amyloidosis». *Biochem Biophys Res Commun* 232: 497-502.

Andreyev AY, Kushnareva YE et Starkov AA. 2005. «Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species». *Biochemistry (Mosc)* 70: 200-214.

Baden EM, Owen BA, Peterson FC, Volkman BF, Ramirez-Alvarado M et Thompson JR. 2008. «Altered dimer interface decreases stability in an amyloidogenic protein». *J Biol Chem* 283: 15853-15860.

Baden EM, Sikkink LA et Ramirez-Alvarado M. 2009. «Light chain amyloidosis - current findings and future prospects». *Curr Protein Pept Sci* 10: 500-508.

Bauer HH, Aebi U, Haner M, Hermann R, Muller M et Merkle HP. 1995. «Architecture and polymorphism of fibrillar supramolecular assemblies produced by in vitro aggregation of human calcitonin». *J Struct Biol* 115: 1-15.

Bely M et Makovitzky J. 2006. «Sensitivity and specificity of Congo red staining according to Romhanyi. Comparison with Puchtler's or Bennhold's methods». *Acta Histochem* 108: 175-180.

Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB et Teplow DB. 2003. «Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways». *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 330-335.

Bitan G, Lomakin A et Teplow DB. 2001. «Amyloid beta-protein oligomerization: prenucleation interactions revealed by photo-induced cross-linking of unmodified proteins». *J Biol Chem* 276: 35176-35184.

Bitan G et Rahimi F. 2012. «Non-fibrillar amyloidogenic protein assemblies common cytotoxins underlying degenerative diseases». Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht ; New York.

Bouchard M, Zurdo J, Nettleton EJ, Dobson CM et Robinson CV. 2000. «Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy». *Protein Sci* 9: 1960-1967.

Brändén C-I et Tooze J. 1999. «Introduction to protein structure». Garland Pub., New York.



Brenner DA, Jain M, Pimentel DR, Wang B, Connors LH, Skinner M, Apstein CS et Liao R. 2004. «Human amyloidogenic light chains directly impair cardiomyocyte function through an increase in cellular oxidant stress». *Circ Res* 94: 1008-1010.

Broome BM et Hecht MH. 2000. «Nature disfavors sequences of alternating polar and non-polar amino acids: implications for amyloidogenesis». *J Mol Biol* 296: 961-968.

Bulawa CE, Connelly S, Devit M, Wang L, Weigel C, Fleming JA, Packman J, Powers ET, Wiseman RL, Foss TR, Wilson IA, Kelly JW et Labaudiniere R. 2012. «Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade». *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 9629-9634.

Bush AI. 2003. «The metallobiology of Alzheimer's disease». *Trends Neurosci* 26: 207-214.

Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM et Drake J. 2002. «Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death». *Neurobiol Aging* 23: 655-664.

Buxbaum JN. 2003. «Diseases of protein conformation: what do in vitro experiments tell us about in vivo diseases?». *Trends Biochem Sci* 28: 585-592.

Cacace MG, Landau EM et Ramsden JJ. 1997. «The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena». *Q Rev Biophys* 30: 241-277.

Campioni S, Monsellier E et Chiti F. 2010. «Why Proteins Misfold». In *Protein Misfolding Diseases*. pp 1-20. John Wiley & Sons, Inc.

Canet D, Last AM, Tito P, Sunde M, Spencer A, Archer DB, Redfield C, Robinson CV et Dobson CM. 2002. «Local cooperativity in the unfolding of an amyloidogenic variant of human lysozyme». *Nat Struct Biol* 9: 308-315.

Carter DB. 2005. «The interaction of amyloid-beta with ApoE». *Subcell Biochem* 38: 255-272.

Chan GK, Witkowski A, Gantz DL, Zhang TO, Zanni MT, Jayaraman S et Cavigliolo G. 2015. «Myeloperoxidase-mediated Methionine Oxidation Promotes an Amyloidogenic Outcome for Apolipoprotein A-I». *J Biol Chem* 290: 10958-10971.

Chayen NE. 2005. «Methods for separating nucleation and growth in protein crystallisation». *Prog Biophys Mol Biol* 88: 329-337.

Chen W, Yewdell JW, Levine RL et Bennink JR. 1999. «Modification of cysteine residues in vitro and in vivo affects the immunogenicity and antigenicity of major histocompatibility complex class I-restricted viral determinants». *J Exp Med* 189: 1757-1764.

Chiti F, Calamai M, Taddei N, Stefani M, Ramponi G et Dobson CM. 2002. «Studies of the aggregation of mutant proteins in vitro provide insights into the genetics of amyloid diseases». *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4: 16419-16426.

Chiti F et Dobson CM. 2006. «Protein misfolding, functional amyloid, and human disease». *Annu Rev Biochem* 75: 333-366.

Chiti F et Dobson CM. 2009. «Amyloid formation by globular proteins under native conditions». *Nat Chem Biol* 5: 15-22.

Chiti F, Taddei N, Baroni F, Capanni C, Stefani M, Ramponi G et Dobson CM. 2002. «Kinetic partitioning of protein folding and aggregation». *Nat Struct Biol* 9: 137-143.

Chiti F, Taddei N, Bucciantini M, White P, Ramponi G et Dobson CM. 2000. «Mutational analysis of the propensity for amyloid formation by a globular protein». *EMBO J* 19: 1441-1449.

Chiti F, Taddei N, Stefani M, Dobson CM et Ramponi G. 2001. «Reduction of the amyloidogenicity of a protein by specific binding of ligands to the native conformation». *Protein Sci* 10: 879-886.

Clement CG et Truong LD. 2014. «An evaluation of Congo red fluorescence for the diagnosis of amyloidosis». *Hum Pathol* 45: 1766-1772.

Cohen-Krausz S et Saibil H. 2006. «Three-Dimensional Structural Analysis of Amyloid Fibrils by Electron Microscopy». In *Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases*. Uversky V et Fink A, eds, Vol 4. pp 303-313. Springer US.

Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW et Dillin A. 2006. «Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity». *Science* 313: 1604-1610.

Comenzo RL, Zhang Y, Martinez C, Osman K et Herrera GA. 2001. «The tropism of organ involvement in primary systemic amyloidosis: contributions of Ig V(L) germ line gene use and clonal plasma cell burden». *Blood* 98: 714-720.

Connors LH, Jiang Y, Budnik M, Theberge R, Prokaeva T, Bodi KL, Seldin DC, Costello CE et Skinner M. 2007. «Heterogeneity in primary structure, post-translational modifications, and germline gene usage of nine full-length amyloidogenic kappa1 immunoglobulin light chains». *Biochemistry* 46: 14259-14271.

Conway KA, Harper JD et Lansbury PT, Jr. 2000. «Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid». *Biochemistry* 39: 2552-2563.

Cotman SL, Halfter W et Cole GJ. 2000. «Agrin binds to beta-amyloid (Abeta), accelerates abeta fibril formation, and is localized to Abeta deposits in Alzheimer's disease brain». *Mol Cell Neurosci* 15: 183-198.

Crowther DC, Kinghorn KJ, Miranda E, Page R, Curry JA, Duthie FA, Gubb DC et Lomas DA. 2005. «Intraneuronal Abeta, non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a Drosophila model of Alzheimer's disease». *Neuroscience* 132: 123-135.

Davis PD, Raffin R, Dul LJ, Vogen MS, Williamson KE, Stevens JF et Argon Y. 2000. «Inhibition of amyloid fiber assembly by both BiP and its target peptide». *Immunity* 13: 433-442.

del Pozo-Yauner L, Wall JS, Gonzalez Andrade M, Sanchez-Lopez R, Rodriguez-Ambriz SL, Perez Carreon JI, Ochoa-Leyva A et Fernandez-Velasco DA. 2014. «The N-terminal strand modulates immunoglobulin light chain fibrillogenesis». *Biochem Biophys Res Commun* 443: 495-499.

del Pozo Yauner L, Ortiz E, Sanchez R, Sanchez-Lopez R, Guereca L, Murphy CL, Allen A, Wall JS, Fernandez-Velasco DA, Solomon A et Becerril B. 2008. «Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains». *Proteins* 72: 684-692.

Dill KA et Chan HS. 1997. «From Levinthal to pathways to funnels». *Nat Struct Biol* 4: 10-19.

Dobson C. 2006. «The Generic Nature of Protein Folding and Misfolding». In Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases. Uversky V et Fink A, eds, Vol 4. pp 21-41. Springer US.

Dobson CM. 1999. «Protein misfolding, evolution and disease». *Trends Biochem Sci* 24: 329-332.

Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM et Paul SM. 2002. «Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model». *Nat Neurosci* 5: 452-457.

Dumoulin M, Last AM, Desmyter A, Decanniere K, Canet D, Larsson G, Spencer A, Archer DB, Sasse J, Muyldermans S, Wyns L, Redfield C, Matagne A, Robinson CV et Dobson CM. 2003. «A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme». *Nature* 424: 783-788.

Dunkelberger EB, Buchanan LE, Marek P, Cao P, Raleigh DP et Zanni MT. 2012. «Deamidation accelerates amyloid formation and alters amylin fiber structure». *J Am Chem Soc* 134: 12658-12667.



Eakin CM, Berman AJ et Miranker AD. 2006. «A native to amyloidogenic transition regulated by a backbone trigger». *Nat Struct Mol Biol* 13: 202-208.

Ellis RJ et Minton AP. 2006. «Protein aggregation in crowded environments». *Biol Chem* 387: 485-497.

Fandrich M et Dobson CM. 2002. «The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation». *EMBO J* 21: 5682-5690.

Ferrao-Gonzales AD, Souto SO, Silva JL et Foguel D. 2000. «The preaggregated state of an amyloidogenic protein: hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state». *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6445-6450.

Fitzpatrick AW, Debelouchina GT, Bayro MJ, Clare DK, Caporini MA, Bajaj VS, Jaroniec CP, Wang L, Ladizhansky V, Muller SA, MacPhee CE, Waudby CA, Mott HR, De Simone A, Knowles TP, Saibil HR, Vendruscolo M, Orlova EV, Griffin RG et Dobson CM. 2013. «Atomic structure and hierarchical assembly of a cross-beta amyloid fibril». *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 5468-5473.

Fung SY, Keyes C, Duhamel J et Chen P. 2003. «Concentration effect on the aggregation of a self-assembling oligopeptide». *Biophys J* 85: 537-548.

Gertz HJ, Siegers A et Kuchinke J. 1994. «Stability of cell size and nucleolar size in Lewy body containing neurons of substantia nigra in Parkinson's disease». *Brain Res* 637: 339-341.

Gertz MA. 2014. «Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2014 update on diagnosis, prognosis, and treatment». *Am J Hematol* 89: 1132-1140.

Gertz MA et Kyle RA. 1989. «Primary systemic amyloidosis--a diagnostic primer». *Mayo Clin Proc* 64: 1505-1519.

Gertz MA et Kyle RA. 1990. «Prognostic value of urinary protein in primary systemic amyloidosis (AL)». *Am J Clin Pathol* 94: 313-317.

Gertz MA et Kyle RA. 1997. «Hepatic amyloidosis: clinical appraisal in 77 patients». *Hepatology* 25: 118-121.

Gertz MA, Lacy MQ et Dispenzieri A. 1999. «Amyloidosis». *Hematol Oncol Clin North Am* 13: 1211-1233, ix.

Geula C, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M et Yankner BA. 1998. «Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity». *Nat Med* 4: 827-831.

Giasson BI, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ et Lee VM. 2000. «Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions». *Science* 290: 985-989.

Giasson BI, Forman MS, Higuchi M, Golbe LI, Graves CL, Kotzbauer PT, Trojanowski JQ et Lee VM. 2003. «Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein». *Science* 300: 636-640.

Goldsbury CS, Cooper GJ, Goldie KN, Muller SA, Saafi EL, Gruijters WT, Misur MP, Engel A, Aebi U et Kistler J. 1997. «Polymorphic fibrillar assembly of human amylin». *J Struct Biol* 119: 17-27.

Gomes CM. 2012. «Protein misfolding in disease and small molecule therapies». *Curr Top Med Chem* 12: 2460-2469.

Gosal WS, Morten IJ, Hewitt EW, Smith DA, Thomson NH et Radford SE. 2005. «Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid». *J Mol Biol* 351: 850-864.

Gregersen N, Bross P, Vang S et Christensen JH. 2006. «Protein misfolding and human disease». *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7: 103-124.

Guijarro JI, Sunde M, Jones JA, Campbell ID et Dobson CM. 1998. «Amyloid fibril formation by an SH3 domain». *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4224-4228.

Gupta-Bansal R, Frederickson RC et Brunden KR. 1995. «Proteoglycan-mediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation». *J Biol Chem* 270: 18666-18671.

Hamilton JA et Benson MD. 2001. «Transthyretin: a review from a structural perspective». *Cell Mol Life Sci* 58: 1491-1521.

Hammarstrom P, Jiang X, Hurshman AR, Powers ET et Kelly JW. 2002. «Sequence-dependent denaturation energetics: A major determinant in amyloid disease diversity». *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4: 16427-16432.

Hannan AJ. 2012. «Tandem repeat polymorphisms : genetic plasticity, neural diversity, and disease». Landes Bioscience, New York, N.Y.

Harper JD et Lansbury PT, Jr. 1997. «Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins». *Annu Rev Biochem* 66: 385-407.

Harper JD, Lieber CM et Lansbury PT, Jr. 1997a. «Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-beta protein». *Chem Biol* 4: 951-959.

Harper JD, Wong SS, Lieber CM et Lansbury PT. 1997b. «Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy». *Chem Biol* 4: 119-125.

Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow DB et Selkoe DJ. 1999. «Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons». *J Neurosci* 19: 8876-8884.

Hemminki K, Li X, Forsti A, Sundquist J et Sundquist K. 2012. «Incidence and survival in non-hereditary amyloidosis in Sweden». *BMC Public Health* 12: 974.

Hokenson MJ, Uversky VN, Goers J, Yamin G, Munishkina LA et Fink AL. 2004. «Role of individual methionines in the fibrillation of methionine-oxidized alpha-synuclein». *Biochemistry* 43: 4621-4633.

Holm E, Sletten K et Husby G. 1986. «Structural studies of a carbohydrate-containing immunoglobulin-lambda-light-chain amyloid-fibril protein (AL) of variable subgroup III». *Biochem J* 239: 545-551.

Horiguchi T, Uryu K, Giasson BI, Ischiropoulos H, LightFoot R, Bellmann C, Richter-Landsberg C, Lee VM et Trojanowski JQ. 2003. «Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies». *Am J Pathol* 163: 1021-1031.

Hou L, Kang I, Marchant RE et Zagorski MG. 2002. «Methionine 35 oxidation reduces fibril assembly of the amyloid abeta-(1-42) peptide of Alzheimer's disease». *J Biol Chem* 277: 40173-40176.

Houglund JL, Darling J et Flynn S. 2013. «Protein Posttranslational Modification». In *Molecular Basis of Oxidative Stress*. pp 71-92. John Wiley & Sons, Inc.

Hu D, Qin Z, Xue B, Fink AL et Uversky VN. 2008. «Effect of methionine oxidation on the structural properties, conformational stability, and aggregation of immunoglobulin light chain LEN». *Biochemistry* 47: 8665-8677.

Hurle MR, Helms LR, Li L, Chan W et Wetzel R. 1994. «A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis». *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5446-5450.

Iijima K, Liu HP, Chiang AS, Hearn SA, Konsolaki M et Zhong Y. 2004. «Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease». *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6623-6628.

Ionescu-Zanetti C, Khurana R, Gillespie JR, Petrick JS, Trabachino LC, Minert LJ, Carter SA et Fink AL. 1999. «Monitoring the assembly of Ig light-chain amyloid fibrils by atomic force microscopy». *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13175-13179.



Ivarsson Y, Travaglini-Allocatelli C, Brunori M et Gianni S. 2008. «Mechanisms of protein folding». *Eur Biophys J* 37: 721-728.

Jiang X, Smith CS, Petrassi HM, Hammarstrom P, White JT, Sacchettini JC et Kelly JW. 2001. «An engineered transthyretin monomer that is nonamyloidogenic, unless it is partially denatured». *Biochemistry* 40: 11442-11452.

Jimenez JL, Guizarro JJ, Orlova E, Zurdo J, Dobson CM, Sunde M et Saibil HR. 1999. «Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing». *EMBO J* 18: 815-821.

Jimenez JL, Nettleton EJ, Bouchard M, Robinson CV, Dobson CM et Saibil HR. 2002. «The protofilament structure of insulin amyloid fibrils». *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9196-9201.

Johnson SM, Connelly S, Fearn C, Powers ET et Kelly JW. 2012. «The transthyretin amyloidoses: from delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug». *J Mol Biol* 421: 185-203.

Jones EM et Surewicz WK. 2005. «Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids». *Cell* 121: 63-72.

Kakuyama H, Soderberg L, Horigome K, Winblad B, Dahlqvist C, Naslund J et Tjernberg LO. 2005. «CLAC binds to aggregated Abeta and Abeta fragments, and attenuates fibril elongation». *Biochemistry* 44: 15602-15609.

Kayed R, Bernhagen J, Greenfield N, Sweimeh K, Brunner H, Voelter W et Kapurniotu A. 1999. «Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro». *J Mol Biol* 287: 781-796.

Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW et Glabe CG. 2003. «Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis». *Science* 300: 486-489.

Kayed R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE et Glabe CG. 2004. «Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases». *J Biol Chem* 279: 46363-46366.

Keller JN, Gee J et Ding Q. 2002. «The proteasome in brain aging». *Ageing Res Rev* 1: 279-293.

Kelly JW. 1998. «The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways». *Curr Opin Struct Biol* 8: 101-106.

Khandogin J et Brooks CL, 3rd. 2007. «Linking folding with aggregation in Alzheimer's beta-amyloid peptides». *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16880-16885.

Khurana R, Uversky VN, Nielsen L et Fink AL. 2001. «Is Congo red an amyloid-specific dye?». *J Biol Chem* 276: 22715-22721.

Kim Y, Wall JS, Meyer J, Murphy C, Randolph TW, Manning MC, Solomon A et Carpenter JF. 2000. «Thermodynamic modulation of light chain amyloid fibril formation». *J Biol Chem* 275: 1570-1574.

Kirschner DA, Inouye H, Duffy LK, Sinclair A, Lind M et Selkoe DJ. 1987. «Synthetic peptide homologous to beta protein from Alzheimer disease forms amyloid-like fibrils in vitro». *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6953-6957.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y et Shimizu N. 1998. «Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism». *Nature* 392: 605-608.

Kodaka M. 2004. «Interpretation of concentration-dependence in aggregation kinetics». *Biophys Chem* 109: 325-332.

Kolmar H, Frisch C, Kleemann G, Gotze K, Stevens FJ et Fritz HJ. 1994. «Dimerization of Bence Jones proteins: linking the rate of transcription from an Escherichia coli promoter to the association constant of REIV». *Biol Chem Hoppe Seyler* 375: 61-70.

Konno T. 2001. «Amyloid-induced aggregation and precipitation of soluble proteins: an electrostatic contribution of the Alzheimer's beta(25-35) amyloid fibril». *Biochemistry* 40: 2148-2154.

Kubo T, Kumagai Y, Miller CA et Kaneko I. 2003. «Beta-amyloid racemized at the Ser26 residue in the brains of patients with Alzheimer disease: implications in the pathogenesis of Alzheimer disease». *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 248-259.

Kyle RA et Gertz MA. 1995. «Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratory features in 474 cases». *Semin Hematol* 32: 45-59.

Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ et Therneau TM. 1999. «Long-term survival (10 years or more) in 30 patients with primary amyloidosis». *Blood* 93: 1062-1066.

Kyle RA et Greipp PR. 1983. «Amyloidosis (AL). Clinical and laboratory features in 229 cases». *Mayo Clin Proc* 58: 665-683.

Kyle RA, Greipp PR et O'Fallon WM. 1986. «Primary systemic amyloidosis: multivariate analysis for prognostic factors in 168 cases». *Blood* 68: 220-224.

Lansbury PT et Lashuel HA. 2006. «A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic». *Nature* 443: 774-779.

Larson J, Lynch G, Games D et Seubert P. 1999. «Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice». *Brain Res* 840: 23-35.

Levine RL, Moskovitz J et Stadtman ER. 2000. «Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation». *IUBMB Life* 50: 301-307.

Liko I, Mak M, Klement E, Hunyadi-Gulyas E, Pazmany T, Medzihradszky KF et Urbanyi Z. 2007. «Evidence for an extended interacting surface between beta-amyloid and serum amyloid P component». *Neurosci Lett* 412: 51-55.

Liu L, Komatsu H, Murray IV et Axelsen PH. 2008. «Promotion of amyloid beta protein misfolding and fibrillogenesis by a lipid oxidation product». *J Mol Biol* 377: 1236-1250.

Lo Bianco C, Ridet JL, Schneider BL, Deglon N et Aebischer P. 2002. «alpha -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease». *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10813-10818.

Lomas DA et Carrell RW. 2002. «Serpinoopathies and the conformational dementias». *Nat Rev Genet* 3: 759-768.

Lorenzo A et Yankner BA. 1994. «Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red». *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12243-12247.

Lu J, Yu Y, Zhu I, Cheng Y et Sun PD. 2014. «Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis». *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 5189-5194.

Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE et Rogers J. 1999. «Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease». *Am J Pathol* 155: 853-862.

Mahajan N, Maggi LB, Tomasson MH et Weber JD. 2015. «Abstract LB-298: The multiple-myeloma associated snoRNA, ACA11 increases oxidative stress and cell proliferation». *Cancer Research* 75: LB-298.

Martin DJ et Ramirez-Alvarado M. 2010. «Comparison of amyloid fibril formation by two closely related immunoglobulin light chain variable domains». *Amyloid* 17: 129-136.



Martin DJ et Ramirez-Alvarado M. 2011. «Glycosaminoglycans promote fibril formation by amyloidogenic immunoglobulin light chains through a transient interaction». *Biophys Chem* 158: 81-89.

Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A et Mucke L. 2000. «Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders». *Science* 287: 1265-1269.

McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI et Masters CL. 1999. «Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease». *Ann Neurol* 46: 860-866.

Merlini G et Bellotti V. 2003. «Molecular mechanisms of amyloidosis». *N Engl J Med* 349: 583-596.

Merlini G et Westermarck P. 2004. «The systemic amyloidoses: clearer understanding of the molecular mechanisms offers hope for more effective therapies». *J Intern Med* 255: 159-178.

Miyata T, Taneda S, Kawai R, Ueda Y, Horiuchi S, Hara M, Maeda K et Monnier VM. 1996. «Identification of pentosidine as a native structure for advanced glycation end products in beta-2-microglobulin-containing amyloid fibrils in patients with dialysis-related amyloidosis». *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2353-2358.

Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B et Van Leuven F. 1999. «Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain». *J Biol Chem* 274: 6483-6492.

Mohiuddin I, Chai H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q et Chen C. 2006. «Nitrotyrosine and chlorotyrosine: clinical significance and biological functions in the vascular system». *J Surg Res* 133: 143-149.

Morley JF, Brignull HR, Weyers JJ et Morimoto RI. 2002. «The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*». *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10417-10422.

Morozova-Roche LA, Zamotin V, Malisauskas M, Ohman A, Chertkova R, Lavrikova MA, Kostanyan IA, Dolgikh DA et Kirpichnikov MP. 2004. «Fibrillation of carrier protein albebetin and its biologically active constructs. Multiple oligomeric intermediates and pathways». *Biochemistry* 43: 9610-9619.

Naiki H, Hashimoto N, Suzuki S, Kimura H, Nakakuki K et Gejyo F. 1997. «Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension in vitro». *Amyloid* 4: 223-232.

Nasstrom T, Fagerqvist T, Barbu M, Karlsson M, Nikolajeff F, Kasrayan A, Ekberg M, Lannfelt L, Ingelsson M et Bergstrom J. 2011. «The lipid peroxidation products 4-oxo-2-nonenal and 4-hydroxy-2-nonenal promote the formation of alpha-synuclein oligomers with distinct biochemical, morphological, and functional properties». *Free Radic Biol Med* 50: 428-437.

Nieva J, Shafon A, Altobelli LJ, 3rd, Tripuraneni S, Rogel JK, Wentworth AD, Lerner RA et Wentworth P, Jr. 2008. «Lipid-derived aldehydes accelerate light chain amyloid and amorphous aggregation». *Biochemistry* 47: 7695-7705.

Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, Stenh C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Naslund J et Lannfelt L. 2001. «The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation». *Nat Neurosci* 4: 887-893.

Nilsson MR. 2004. «Techniques to study amyloid fibril formation in vitro». *Methods* 34: 151-160.

Nilsson MR. 2008. «Role of Post-translational Chemical Modifications in Amyloid Fibril Formation». In *Amyloid Proteins*. pp 81-109. Wiley-VCH Verlag GmbH.

Nilsson MR et Dobson CM. 2003. «Chemical modification of insulin in amyloid fibrils». *Protein Sci* 12: 2637-2641.

Norris EH, Giasson BI, Ischiropoulos H et Lee VM. 2003. «Effects of oxidative and nitrative challenges on alpha-synuclein fibrillogenesis involve distinct mechanisms of protein modifications». *J Biol Chem* 278: 27230-27240.

Olsen KE, Sletten K et Westermark P. 1998. «Fragments of the constant region of immunoglobulin light chains are constituents of AL-amyloid proteins». *Biochem Biophys Res Commun* 251: 642-647.

Omtvedt LA, Husby G, Cornwell GG, 3rd, Kyle RA et Sletten K. 1997. «The amino acid sequence of the glycosylated amyloid immunoglobulin light chain protein AL MS». *Scand J Immunol* 45: 551-556.

Onuchic JN et Wolynes PG. 2004. «Theory of protein folding». *Curr Opin Struct Biol* 14: 70-75.

Otzen DE, Kristensen O et Oliveberg M. 2000. «Designed protein tetramer zipped together with a hydrophobic Alzheimer homology: a structural clue to amyloid assembly». *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9907-9912.

Ozaki S, Abe M, Wolfenbarger D, Weiss DT et Solomon A. 1994. «Preferential expression of human lambda-light-chain variable-region subgroups in multiple myeloma, AL amyloidosis, and Waldenstrom's macroglobulinemia». *Clin Immunol Immunopathol* 71: 183-189.

Palmblad M, Westlind-Danielsson A et Bergquist J. 2002. «Oxidation of methionine 35 attenuates formation of amyloid beta -peptide 1-40 oligomers». *J Biol Chem* 277: 19506-19510.

Parrini C, Taddei N, Ramazzotti M, Degl'Innocenti D, Ramponi G, Dobson CM et Chiti F. 2005. «Glycine residues appear to be evolutionarily conserved for their ability to inhibit aggregation». *Structure* 13: 1143-1151.

Paz Gavilan M, Vela J, Castano A, Ramos B, del Rio JC, Vitorica J et Ruano D. 2006. «Cellular environment facilitates protein accumulation in aged rat hippocampus». *Neurobiol Aging* 27: 973-982.

Pedersen JS, Christensen G et Otzen DE. 2004. «Modulation of S6 fibrillation by unfolding rates and gatekeeper residues». *J Mol Biol* 341: 575-588.

Pedersen JS, Dikov D, Flink JL, Hjuler HA, Christiansen G et Otzen DE. 2006. «The changing face of glucagon fibrillation: structural polymorphism and conformational imprinting». *J Mol Biol* 355: 501-523.

Pepys MB. 2001. «Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis». *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356: 203-210; discussion 210-201.

Perfetti V, Casarini S, Palladini G, Vignarelli MC, Klersy C, Diegoli M, Ascari E et Merlini G. 2002. «Analysis of V(lambda)-J(lambda) expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies 3r (lambdaIII) as a new amyloid-associated germline gene segment». *Blood* 100: 948-953.

Petkova AT, Leapman RD, Guo Z, Yau WM, Mattson MP et Tycko R. 2005. «Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils». *Science* 307: 262-265.

Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG et Cotman CW. 1991. «In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity». *Brain Res* 563: 311-314.

Podlisny MB, Ostaszewski BL, Squazzo SL, Koo EH, Rydell RE, Teplow DB et Selkoe DJ. 1995. «Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture». *J Biol Chem* 270: 9564-9570.

Pokkuluri PR, Solomon A, Weiss DT, Stevens FJ et Schiffer M. 1999. «Tertiary structure of human lambda 6 light chains». *Amyloid* 6: 165-171.



Poshusta TL, Sikkink LA, Leung N, Clark RJ, Dispenzieri A et Ramirez-Alvarado M. 2009. «Mutations in specific structural regions of immunoglobulin light chains are associated with free light chain levels in patients with AL amyloidosis». *PLoS One* 4: e5169.

Powers ET et Powers DL. 2008. «Mechanisms of protein fibril formation: nucleated polymerization with competing off-pathway aggregation». *Biophys J* 94: 379-391.

Prokaeva T, Spencer B, Kaut M, Ozonoff A, Doros G, Connors LH, Skinner M et Seldin DC. 2007. «Soft tissue, joint, and bone manifestations of AL amyloidosis: clinical presentation, molecular features, and survival». *Arthritis Rheum* 56: 3858-3868.

Qahwash IM, Boire A, Lanning J, Krausz T, Pytel P et Meredith SC. 2007. «Site-specific effects of peptide lipidation on beta-amyloid aggregation and cytotoxicity». *J Biol Chem* 282: 36987-36997.

Qin Z, Hu D, Han S, Reaney SH, Di Monte DA et Fink AL. 2007. «Effect of 4-hydroxy-2-nonenal modification on alpha-synuclein aggregation». *J Biol Chem* 282: 5862-5870.

Qin Z, Hu D, Zhu M et Fink AL. 2007. «Structural characterization of the partially folded intermediates of an immunoglobulin light chain leading to amyloid fibrillation and amorphous aggregation». *Biochemistry* 46: 3521-3531.

Quintas A, Vaz DC, Cardoso I, Saraiva MJ et Brito RM. 2001. «Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants». *J Biol Chem* 276: 27207-27213.

Raffen R, Dieckman LJ, Szpunar M, Wunschl C, Pokkuluri PR, Dave P, Wilkins Stevens P, Cai X, Schiffer M et Stevens FJ. 1999. «Physicochemical consequences of amino acid variations that contribute to fibril formation by immunoglobulin light chains». *Protein Sci* 8: 509-517.

Rajkumar SV, Gertz MA et Kyle RA. 1998. «Primary systemic amyloidosis with delayed progression to multiple myeloma». *Cancer* 82: 1501-1505.

Ramirez-Alvarado M, De Stigter J, Baden E, Sikkink L, McLaughlin R et Taboas A. 2007. «Immunoglobulin Light Chain and Systemic Light-Chain Amyloidosis». In *Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases*. Uversky V et Fink A, eds, Vol 6. pp 183-197. Springer US.

Ray SS, Nowak RJ, Brown RH, Jr. et Lansbury PT, Jr. 2005. «Small-molecule-mediated stabilization of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase mutants against unfolding and aggregation». *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3639-3644.

Reixach N, Deechongkit S, Jiang X, Kelly JW et Buxbaum JN. 2004. «Tissue damage in the amyloidoses: Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture». *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2817-2822.

Relini A, Canale C, De Stefano S, Rolandi R, Giorgetti S, Stoppini M, Rossi A, Fogolari F, Corazza A, Esposito G, Gliozzi A et Bellotti V. 2006. «Collagen plays an active role in the aggregation of beta2-microglobulin under physiopathological conditions of dialysis-related amyloidosis». *J Biol Chem* 281: 16521-16529.

Rochet JC. 2007. «Novel therapeutic strategies for the treatment of protein-misfolding diseases». *Expert Rev Mol Med* 9: 1-34.

Roher AE, Chaney MO, Kuo YM, Webster SD, Stine WB, Haverkamp LJ, Woods AS, Cotter RJ, Tuohy JM, Krafft GA, Bonnell BS et Emmerling MR. 1996. «Morphology and toxicity of Abeta-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease». *J Biol Chem* 271: 20631-20635.

Sacchettini JC et Kelly JW. 2002. «Therapeutic strategies for human amyloid diseases». *Nat Rev Drug Discov* 1: 267-275.

Schmittschmitt JP et Scholtz JM. 2003. «The role of protein stability, solubility, and net charge in amyloid fibril formation». *Protein Sci* 12: 2374-2378.

Schwartz R, Istrail S et King J. 2001. «Frequencies of amino acid strings in globular protein sequences indicate suppression of blocks of consecutive hydrophobic residues». *Protein Sci* 10: 1023-1031.

Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, Serpell L, Arnsdorf MF et Lindquist SL. 2000. «Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant». *Science* 289: 1317-1321.

Serpell LC, Sunde M, Benson MD, Tennent GA, Pepys MB et Fraser PE. 2000. «The protofilament substructure of amyloid fibrils». *J Mol Biol* 300: 1033-1039.

Sezer O, Eucker J, Schmid P et Possinger K. 2000. «New therapeutic approaches in primary systemic AL amyloidosis». *Ann Hematol* 79: 1-6.

Shimizu A. 2006. «[Analysis of variant and modified structures of proteins by mass spectrometry--application for clinical laboratory test]». *Rinsho Byori* 54: 924-934.

Shirahama T et Cohen AS. 1967. «High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril». *J Cell Biol* 33: 679-708.

Sikkink LA et Ramirez-Alvarado M. 2008. «Salts enhance both protein stability and amyloid formation of an immunoglobulin light chain». *Biophys Chem* 135: 25-31.

Smith JE, Mowles AK, Mehta AK et Lynn DG. 2014. «Looked at life from both sides now». *Life (Basel)* 4: 887-902.

Soderberg L, Dahlqvist C, Kakuyama H, Thyberg J, Ito A, Winblad B, Naslund J et Tjernberg LO. 2005. «Collagenous Alzheimer amyloid plaque component assembles amyloid fibrils into protease resistant aggregates». *FEBS J* 272: 2231-2236.

Solomon A. 1985. «Light chains of human immunoglobulins». *Methods Enzymol* 116: 101-121.

Solomon A, Frangione B et Franklin EC. 1982. «Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. Preferential association of the V lambda VI subgroup of human light chains with amyloidosis AL (lambda)». *J Clin Invest* 70: 453-460.

Solomon A et Weiss DT. 1995. «Protein and host factors implicated in the pathogenesis of light chain amyloidosis (AL amyloidosis)». *Amyloid* 2: 269-279.

Soskic V, Groebe K et Schrattenholz A. 2008. «Nonenzymatic posttranslational protein modifications in ageing». *Exp Gerontol* 43: 247-257.

Soti C et Csermely P. 2003. «Aging and molecular chaperones». *Exp Gerontol* 38: 1037-1040.

Soti C, Pal C, Papp B et Csermely P. 2005. «Molecular chaperones as regulatory elements of cellular networks». *Curr Opin Cell Biol* 17: 210-215.

Souillac PO, Uversky VN et Fink AL. 2003. «Structural transformations of oligomeric intermediates in the fibrillation of the immunoglobulin light chain LEN». *Biochemistry* 42: 8094-8104.

Souillac PO, Uversky VN, Millett IS, Khurana R, Doniach S et Fink AL. 2002. «Effect of association state and conformational stability on the kinetics of immunoglobulin light chain amyloid fibril formation at physiological pH». *J Biol Chem* 277: 12657-12665.

Souillac PO, Uversky VN, Millett IS, Khurana R, Doniach S et Fink AL. 2002. «Elucidation of the molecular mechanism during the early events in immunoglobulin light chain amyloid fibrillation. Evidence for an off-pathway oligomer at acidic pH». *J Biol Chem* 277: 12666-12679.

Sousa MM, Cardoso I, Fernandes R, Guimaraes A et Saraiva MJ. 2001. «Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates». *Am J Pathol* 159: 1993-2000.



Souza JM, Daikhin E, Yudkoff M, Raman CS et Ischiropoulos H. 1999. «Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration». *Arch Biochem Biophys* 371: 169-178.

Stadtman ER. 2001. «Protein oxidation in aging and age-related diseases». *Ann N Y Acad Sci* 928: 22-38.

Stevens FJ. 2000. «Four structural risk factors identify most fibril-forming kappa light chains». *Amyloid* 7: 200-211.

Stevens FJ, Westholm FA, Solomon A et Schiffer M. 1980. «Self-association of human immunoglobulin kappa I light chains: role of the third hypervariable region». *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 1144-1148.

Stevens PW, Raffin R, Hanson DK, Deng YL, Berrios-Hammond M, Westholm FA, Murphy C, Eulitz M, Wetzel R, Solomon A et et al. 1995. «Recombinant immunoglobulin variable domains generated from synthetic genes provide a system for in vitro characterization of light-chain amyloid proteins». *Protein Sci* 4: 421-432.

Steward A, Adhya S et Clarke J. 2002. «Sequence conservation in Ig-like domains: the role of highly conserved proline residues in the fibronectin type III superfamily». *J Mol Biol* 318: 935-940.

Strange RW, Antonyuk S, Hough MA, Doucette PA, Rodriguez JA, Hart PJ, Hayward LJ, Valentine JS et Hasnain SS. 2003. «The structure of holo and metal-deficient wild-type human Cu, Zn superoxide dismutase and its relevance to familial amyotrophic lateral sclerosis». *J Mol Biol* 328: 877-891.

Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB et Blake CC. 1997. «Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction». *J Mol Biol* 273: 729-739.

Tanaka M, Chien P, Yonekura K et Weissman JS. 2005. «Mechanism of cross-species prion transmission: an infectious conformation compatible with two highly divergent yeast prion proteins». *Cell* 121: 49-62.

Tennent GA, Lovat LB et Pepys MB. 1995. «Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis». *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4299-4303.

Thakur AK, Jayaraman M, Mishra R, Thakur M, Chellgren VM, Byeon IJ, Anjum DH, Kodali R, Creamer TP, Conway JF, Gronenborn AM et Wetzell R. 2009. «Polyglutamine disruption of the huntingtin exon 1 N terminus triggers a complex aggregation mechanism». *Nat Struct Mol Biol* 16: 380-389.

Thirumalai D, O'Brien EP, Morrison G et Hyeon C. 2010. «Theoretical perspectives on protein folding». *Annu Rev Biophys* 39: 159-183.

Tomiyama T, Asano S, Furiya Y, Shirasawa T, Endo N et Mori H. 1994. «Racemization of Asp23 residue affects the aggregation properties of Alzheimer amyloid beta protein analogues». *J Biol Chem* 269: 10205-10208.

Toyama BH et Weissman JS. 2011. «Amyloid structure: conformational diversity and consequences». *Annu Rev Biochem* 80: 557-585.

Trostchansky A, Lind S, Hodara R, Oe T, Blair IA, Ischiropoulos H, Rubbo H et Souza JM. 2006. «Interaction with phospholipids modulates alpha-synuclein nitration and lipid-protein adduct formation». *Biochem J* 393: 343-349.

Tycko R. 2014. «Physical and structural basis for polymorphism in amyloid fibrils». *Protein Sci* 23: 1528-1539.

Uchida K et Stadtman ER. 1992. «Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal». *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4544-4548.

Uversky VN. 2002. «Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics». *Protein Sci* 11: 739-756.

Uversky VN et Fink AL. 2004. «Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded». *Biochim Biophys Acta* 1698: 131-153.

Uversky VN, Li J et Fink AL. 2001. «Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure». *J Biol Chem* 276: 44284-44296.

Uversky VN, Li J, Souillac P, Millett IS, Doniach S, Jakes R, Goedert M et Fink AL. 2002. «Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins». *J Biol Chem* 277: 11970-11978.

Villegas V, Zurdo J, Filimonov VV, Aviles FX, Dobson CM et Serrano L. 2000. «Protein engineering as a strategy to avoid formation of amyloid fibrils». *Protein Sci* 9: 1700-1708.

Volkin DB, Mach H et Middaugh CR. 1995. «Degradative covalent reactions important to protein stability». *Methods Mol Biol* 40: 35-63.

Wall J, Schell M, Murphy C, Hrnčić R, Stevens FJ et Solomon A. 1999. «Thermodynamic instability of human lambda 6 light chains: correlation with fibrillogenicity». *Biochemistry* 38: 14101-14108.

Wall JS, Gupta V, Wilkerson M, Schell M, Loris R, Adams P, Solomon A, Stevens F et Dealwis C. 2004. «Structural basis of light chain amyloidogenicity: comparison of the thermodynamic properties, fibrillogenic potential and tertiary structural features of four Vλ6 proteins». *Journal of Molecular Recognition* 17: 323-331.

Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ et Teplow DB. 1999. «Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates». *J Biol Chem* 274: 25945-25952.

Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condron MM et Teplow DB. 1997. «Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate». *J Biol Chem* 272: 22364-22372.

Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB et Selkoe DJ. 2000. «The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain». *Biochemistry* 39: 10831-10839.

Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ et Lee VM. 1999. «The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging». *Exp Neurol* 158: 328-337.

Watarai H, Nozawa R, Tokunaga A, Yuyama N, Tomas M, Hinohara A, Ishizaka K et Ishii Y. 2000. «Posttranslational modification of the glycosylation inhibiting factor (GIF) gene product generates bioactive GIF». *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13251-13256.

Weber DK, Gehman JD, Separovic F et Sani M-A. 2012. «Copper Modulation of Amyloid Beta 42 Interactions with Model Membranes». *Australian Journal of Chemistry* 65: 472-479.

Westermarck P, Benson MD, Buxbaum JN, Cohen AS, Frangione B, Ikeda S, Masters CL, Merlini G, Saraiva MJ et Sipe JD. 2005. «Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis». *Amyloid* 12: 1-4.

Wetzel R. 1997. «Domain stability in immunoglobulin light chain deposition disorders». *Adv Protein Chem* 50: 183-242.

Wu KP, Kim S, Fela DA et Baum J. 2008. «Characterization of conformational and dynamic properties of natively unfolded human and mouse alpha-synuclein ensembles by NMR: implication for aggregation». *J Mol Biol* 378: 1104-1115.

Wurth C, Guimard NK et Hecht MH. 2002. «Mutations that reduce aggregation of the Alzheimer's Abeta42 peptide: an unbiased search for the sequence determinants of Abeta amyloidogenesis». *J Mol Biol* 319: 1279-1290.



Xiang W, Schlachetzki JC, Helling S, Bussmann JC, Berlinghof M, Schaffer TE, Marcus K, Winkler J, Klucken J et Becker CM. 2013. «Oxidative stress-induced posttranslational modifications of alpha-synuclein: specific modification of alpha-synuclein by 4-hydroxy-2-nonenal increases dopaminergic toxicity». *Mol Cell Neurosci* 54: 71-83.

Yamaguchi I, Suda H, Tsuzuike N, Seto K, Seki M, Yamaguchi Y, Hasegawa K, Takahashi N, Yamamoto S, Gejyo F et Naiki H. 2003. «Glycosaminoglycan and proteoglycan inhibit the depolymerization of beta2-microglobulin amyloid fibrils in vitro». *Kidney Int* 64: 1080-1088.

Zhang Y, Furyk S, Bergbreiter DE et Cremer PS. 2005. «Specific ion effects on the water solubility of macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister series». *J Am Chem Soc* 127: 14505-14510.

Zhao L, Buxbaum JN et Reixach N. 2013. «Age-related oxidative modifications of transthyretin modulate its amyloidogenicity». *Biochemistry* 52: 1913-1926.